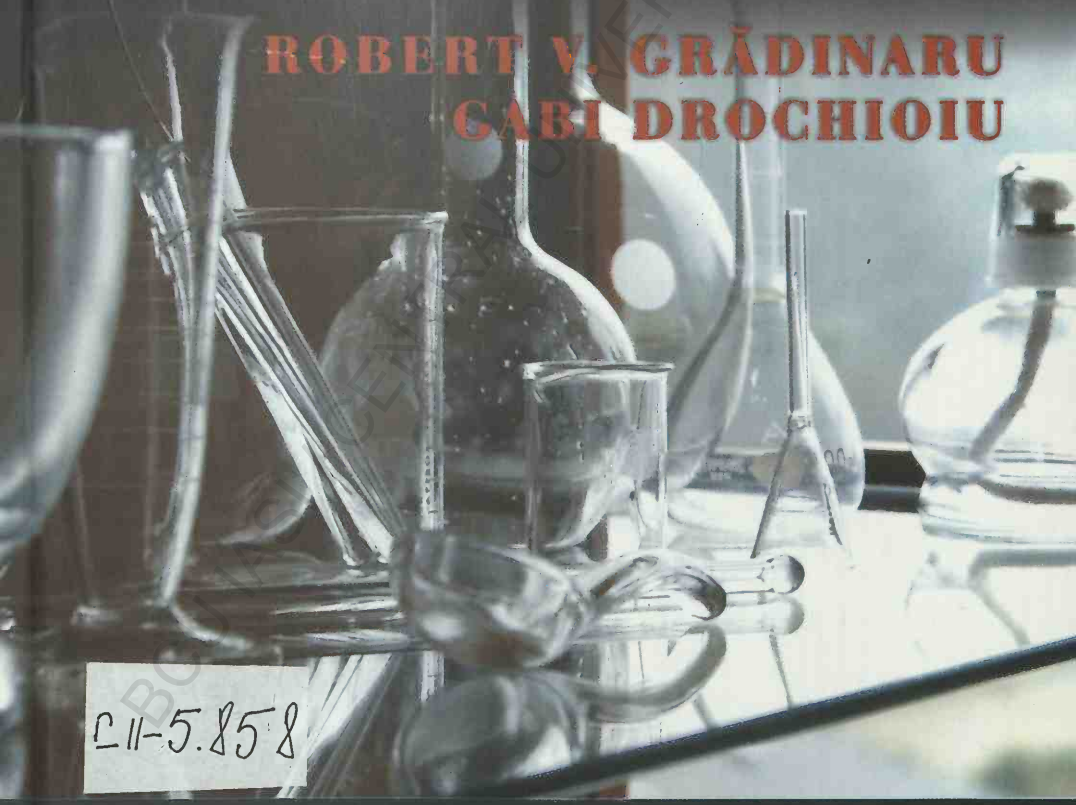
INTRODUCERE ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE

DE LA TEORIE LA EXPERIMENT

ROBERT V. GRĂDINARU
GABI DROCHIOIU



C II-5.858

EDITURA UNIVERSITĂŢII „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAŞI

CU-5858

ROBERT V. GRĂDINARU, GABI DROCHIOIU

INTRODUCERE ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE, DE LA TEORIE LA EXPERIMENT

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lucrarea a fost realizată cu sprijinul financiar al Guvernului României, prin intermediul UEFISCDI, în cadrul Programului 4, *Parteneriate în domeniile prioritare*, Proiect *Biometac*, Contract 32-173/2008.

Corector: Raluca BUZDUGAN
Coperta: Manuela OBOROCEANU
Tehnoredactor: Luminiţa RĂDUCANU

ISBN 978-973-640-686-7

© Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza", 2011
700109 – Iaşi, str. Pinului, nr. 1A, tel./fax: (0232) 314947
http:// www.editura.uaic.ro e-mail: editura@uaic.ro

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ROBERT V. GRĂDINARU, GABI DROCHIOIU

INTRODUCERE ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE, DE LA TEORIE LA EXPERIMENT

666345
B.C.U. IASI

EDITURA UNIVERSITĂŢII „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAŞI
2011

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
GRĂDINARU, ROBERT V.
Introducere în laboratorul de biochimie, de la teorie la experiment /
Robert V. Grădinaru, Gabi Drochioiu. - Iaşi : Editura
Universităţii "Al. I. Cuza", 2011
Bibliogr.
ISBN 978-973-640-686-7

I. Drochioiu, Gabi

577.1

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Cuvânt înainte 7

1. Organizarea activității în laboratorul de biochimie 9
1.1. Reguli de protecție în laborator 9
1.2. Materiale necesare în laboratorul de biochimie 12
1.3. Utilizarea reactivilor biochimici şi soluțiilor. Calitatea apei 12
1.4. Manipularea materialelor şi instrumentelor 13

2. Utilizarea calculatorului în Biochimie şi Biologie moleculară 25
Literatura biochimică 26
Folosirea internetului în biochimie 34

3. Tehnici de bază în biochimia experimentală 41
3.1. Alegerea soluției tampon în biochimie 41
3.2. Metode de estimare a concentrației proteinelor 43
3.2.1. Metoda biuretului şi metoda Lowry 43
3.2.2. Testul Bradford 43
3.2.3. Testul cu acid bicinconinic 44
3.2.4. Metoda spectrofotometrică directă 46
3.2.5. Partea experimentală:
Determinarea concentrației proteinelor din diverse surse 47
3.3. Metode de estimare a concentrației acizilor nucleici 49
3.4. Tehnici de preparare a probelor 55
3.4.1. Precipitarea 55
3.4.2. Dializa şi ultrafiltrarea 61
3.4.3. Liofilizarea 64
3.4.4. Centrifugarea 65
3.4.5. Marcarea probelor biologice cu radioizotopi 69

4. Separarea şi detecția proteinelor şi acizilor nucleici. Amplificarea ADN-ului 75
4.1. Electroforeza cu ajutorul gelurilor de SDS-poliacrilamidă 75
4.2. Tehnica Western Blot 84
4.3. Testul ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) 91
4.4. Separarea ADN-ului prin electroforeză 100
4.5. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) 103

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Purificarea şi identificarea substanţelor prin cromatografie 113
5.1. Cromatografia în strat subţire 113
5.2. Cromatografia de schimb ionic 119
5.3. Cromatografia de excludere a masei moleculare 128
5.4. Cromatografia de afinitate 132
5.5. HPLC 136

6. Măsurarea activităţii enzimatice 143
6.1. Determinarea activităţii enzimatice a unor enzime din diverse surse 143
6.1.1. Determinarea activităţii catalitice a peroxidazei din hrean 143
6.1.2. Determinarea activităţii catalazei. Influenţa pH-ului, temperaturii şi a tăriei ionice asupra vitezei de reacţie 148
6.1.3. Caracterizarea polifenoloxidazei din banane 151
6.1.4. Determinarea activităţii β-amilazei 153
6.2. Enzime plasmatice cu valoare diagnostică 155
6.2.1. Măsurarea activităţii enzimatice: consideraţii generale 157
6.2.2. Creatin kinaza 158
6.2.3. Fosfataza alcalină 160
6.2.4. γ-Glutamil-traspeptidaza 162
6.2.5. Lactat dehidrogenaza 166
6.2.6. Hidroxibutirat dehidrogenaza 167
6.2.7. Aminotransferazele 167

7. Metode Spectroscopice 171
7.1. Fotometrie UV-VIS 171
7.2. Măsurători de turbiditate 173
7.3. Fluorescenţă şi bioluminiscenţă 173
7.4. Rezonanţă magnetică nucleară 180
7.5. Spectrometria de masă 184
7.5.1. Principiile de funcţionare a spectrometrelor de masă 184
7.5.2. Ionizarea prin electrospray (ESI) 187
7.5.3. Ionizarea din matrice prin desorbţie asistată de laser (MALDI) 193
7.5.4. Spectrometria de masă în tandem: informaţii privind structura şi secvenţa compuşilor folosind spectrometria de masă 198
7.5.5. Aplicaţii ale spectrometriei de masă 204

BCUIA LIBRARY

Cuvânt înainte

Biochimia este o disciplină aflată la interfaţa dintre chimie şi biologie. Interconexiunea cu diversele discipline (enzimologie, biologie moleculară, criminalistică, medicină etc.) conferă biochimiei valenţe nebănuite. Biochimia încearcă să explice mecanismele care apar în procesele vii din punct de vedere chimic. Moleculele „vii", precum proteinele, acizii nucleici, lipidele sau glucidele şi conjugaţii acestora sunt entităţi indispensabile pentru organismele vii. Cunoaşterea structurii, proprietăţilor şi a reacţiilor acestor molecule permite înţelegerea unor fenomene complexe care au loc pe diferite paliere de organizare a materiei vii. Lucrările de laborator propuse în acest manual au menirea de a consolida informaţiile teoretice ale studenţilor. Tehnicile de laborator au fost alese cu scopul de a familiariza studenţii Facultăţii de Chimie cu specificul acestei discipline şi de a consolida cunoştinţele acumulate în primii ani de studii la disciplinele adiacente: Chimie organică, Chimie anorganică şi/sau Chimie analitică. Numărul redus de manuscrise, în special din ultimul deceniu, a constituit una dintre motivaţiile fundamentale pentru conceperea acestui îndrumar. Ultimele două capitole sunt destinate în special studenţilor de la masterat sau doctorat. Întrebările de la sfârşitul fiecărui capitol vin în sprijinul înţelegerii aspectelor teoretice şi practice.

Lucrarea de faţă este rodul colaborării cu studenţii în decursul a patru ani universitari. Scopul acestui îndrumar este de a oferi studenţilor o imagine de ansamblu asupra disciplinei şi de a le

îmbunătăţi abilităţile experimentale, îndreptându-le atenţia şi către activitatea de cercetare din laboratorul de biochimie. Autorii au speranţa că aceste lucrări vor apropia mai mult studenţii de problematicile actuale şi vor permite acestora să abordeze noi provocări experimentale. De asemenea, aşteptăm criticile pertinente ale cititorilor în scopul îmbunătăţirii activităţii de laborator şi a colaborării cu studenţii noştri.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 1

Organizarea activității în laboratorul de biochimie

1.1. Reguli de protecție/lucru în laboratorul de biochimie

În laboratorul de biochimie se folosesc frecvent substanțe toxice și vătămătoare și din acest motiv este de preferat să se lucreze cu volume mici de soluții.

Pentru buna funcționare a laboratorului se impune respectarea următoarelor reguli:

- Nu este permis consumul de alimente și de băuturi în interiorul laboratorului;
- Fumatul este interzis;
- Se va evita aducerea unui volum mare de haine și bagaje în laboratorul de biochimie;
- Pentru reacțiile în care se degajă gaze sau pentru substanțele volatile se vor folosi nișe speciale. În nișe se va stoca o cantitate minimă de reactivi.
- Pentru manipularea substanțelor solide se folosesc spatule din metal sau plastic. Aceste substanțe nu se vor atinge.
- Întotdeauna se va citi de două ori eticheta reactivului folosit în experiment;
- Halatele de laborator trebuie să aibă lungimea necesară;
- Părul lung se poartă strâns lângă corp pentru a se evita incendierea;

BCU "M. EMINESCU" IAȘI
CHIMIE
BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Se vor evita operațiunile lângă flacără. Înainte de folosirea unui solvent organic, studenții trebuie să se asigure că nimeni nu folosește o flacără de gaz;
- Soluțiile corozive sau toxice nu vor fi aruncate în instalația de scurgere din laborator;
- Reziduurile chimice se depun în containere special amenajate;
- Nu mirosiți direct chimicalele din sticle!
- Mercurul, plumbul și alte metale grele sunt toxice pentru organismul uman;
- În laborator vor lucra minim două persoane în cazul manipulărilor riscante;
- În cazul unor accidente mici (tăieturi, arsuri) trebuie utilizată trusa de prim ajutor din laborator;

Leziunile ochilor – se neutralizează substanța cu compusul corespunzător (pentru baze se folosește acid boric 2%, iar pentru acizi se folosește sulfat de magneziu 5%) și se clătesc repetat ochii cu apă pentru timp îndelungat (cel puțin 30 min).

Leziunile pielii – se îndepărtează substanța cu un compus în scopul neutralizării (pentru baze se folosește acid acetic 1%, iar pentru acizi se folosește $NaHCO_3$ 2%) și se clătește sub un jet de apă; se îndepărtează hainele contaminate;

- Se vor supraveghea sursele de curent electric pe parcursul funcționării. Aceste surse nu vor fi manipulate decât cu mâinile uscate.
- La accidentele electrice – se închide siguranța;
- La otrăviri – se iau măsuri pentru limitarea efectelor otrăvirii; *Substanțele otrăvitoare nu se țin pe masa de laborator!*
- În cazul arsurilor se aplică pe părțile arse comprese cu gheață în scopul atenuării durerii; se transportă persoana la spital;
- În cazul unor hemoragii se reduc pierderile de sânge (rana trebuie sa fie la un nivel superior inimii);
- La finalul laboratorului zonele de lucru vor fi lăsate în ordine perfectă;
- În timpul și la finalul laboratorului se impune spălarea mâinilor.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pictogramele şi codurile de identificare

Există 4 grupe de risc şi acestea sunt reprezentate prin pictograme.

Etichetele recipientelor care conţin substanţe trebuie inscripţionate cu „frazele de securitate" corespunzătoare. De exemplu: „S"– prudenţă (S1 – a se păstra sub cheie), „R"– natura riscului (R1 – exploziv în stare uscată; R48/20/21/22 – nociv: pericol de efecte grave asupra sănătăţii la expunere prelungită prin inhalare, în contact cu pielea şi prin înghiţire).

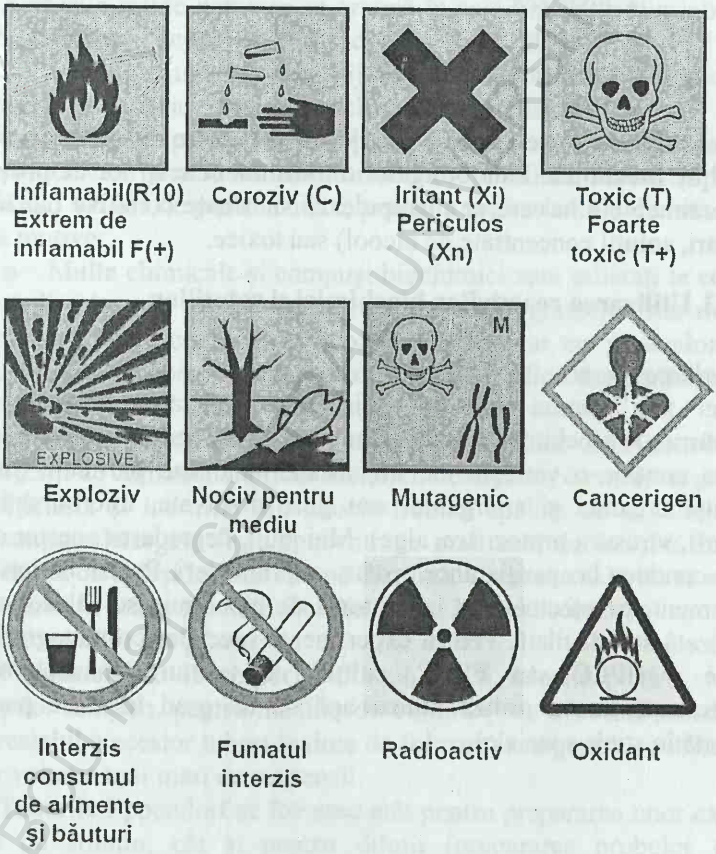


Figura 1.1. Exemple de pictograme şi simboluri folosite în laborator

Etichetele trebuie să aibă fondul roşu, portocaliu sau galben, iar înscrisurile trebuie să fie negre.

1.2. Materiale necesare în laboratorul de biochimie

- Halat de laborator;
- Calculator de buzunar;
- Riglă;
- Foarfecă;
- Creion;
- Marker stabil la apă;
- Lipici.

Ochelarii de protecţie şi mănuşile trebuie să fie nelipsite din laboratorul de biochimie. Este obligatorie folosirea ochelarilor de protecţie în experimentele în care se manipulează substanţe corozive (acizi sau baze tari, soluţii concentrate de alcool) sau toxice.

1.3. Utilizarea reactivilor biochimici şi soluţiilor

Calitatea apei

Cel mai comun solvent utilizat la prepararea soluţiilor din laboratorul de biochimie este apa. Nu se va folosi apa de canal deoarece aceasta conţine o varietate de impurităţi, incluzând particule (nisip), compuşi organici şi anorganici sau gaze dizolvate, microorganisme (bacterii, virusuri, protozoare, alge). Mai mult, degradarea acestor organisme conduce la apariţia unor produşi suplimentari. Pentru majoritatea experimentelor efectuate în laboratorul de biochimie se foloseşte apă deionizată sau distilată. Pentru experimente speciale (cromatografia de lichide - HPLC sau FPLC, culturi de ţesuturi, măsurători de fluorescenţă) se va utiliza numai apă cu un grad înalt de puritate (păstrată în sticle speciale).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4. Manipularea materialelor şi instrumentelor

1. *Pisetele* conţin apă distilată;
2. *Sticlele picurătoare* conţin soluţii alcoolice;
3. *Sticlăria* şi alte materiale necesare pentru laborator se găsesc pe masa de laborator. Sticlăria utilizată se clăteşte cu apă distilată, iar la sfârşitul laboratorului se imersează în recipientul care conţine o soluţie acidă diluată;
4. *Resturile* solide netoxice se aruncă în sacii menajeri din laborator, iar cele toxice se depozitează în recipienţi speciali;
5. *Sticlele* se manipulează cu grijă. Nu trebuie schimbate dopurile de la sticle. După fiecare utilizare sticlele se închid imediat.

Acurateţea experimentală depinde în mare măsură de calitatea echipamentelor şi a instrumentarului. Se vor utiliza numai pipete de sticlă sau vârfuri de pipete curate, pentru a aspira lichide din sticle, din două motive:

- Multe chimicale şi compuşi biochimici sunt utilizaţi la concentraţii mici (de ordinul pictogramelor, microgramelor sau miligramelor). Orice contaminare a pipetei, paharelor sau a cuvelor poate modifica compoziţia soluţiei rezultate şi implicit determină apariţia unor erori mari în experimente;
- Multe biochimicale şi procese biochimice sunt sensibile la agenţi de contaminare (ioni metalici, detergenţi, compuşi organici). Sticlăria şi lucrurile din plastic trebuie spălate cu o soluţie care conţine detergent (la o concentraţie mai mică decât 0,5% în apă), clătite cu apă şi în final cu apă distilată. Uscarea sticlăriei se va face numai în etuve speciale folosite numai în acest scop.

6. *Materialele din plastic*

Flacoanele de 15 respectiv 50 ml pot fi folosite pentru stocarea soluţiilor tampon, pentru mediile de cultură (este necesară sterilizarea în prealabil a acestor tuburi înainte de folosire) sau pentru centrifugarea unor volume mai mari de suspensii.

Tuburile Eppendorf se folosesc atât pentru prepararea unor cantităţi mici de soluţie, cât şi pentru diluţii (prepararea probelor pentru electroforeză – capitolul 4.1). În cazul precipitării unor cantităţi reduse

de compus biochimic (de exemplu precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic), tuburile Eppendorf pot fi folosite la centrifugarea probelor (la o viteză maximă de 12000 rotații pe minut).

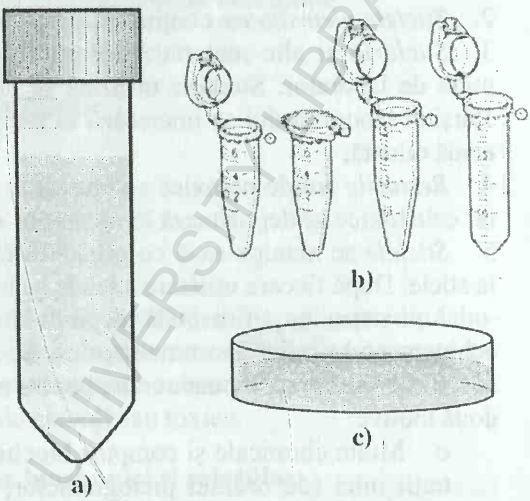


Figura 1.2. Materiale din plastic frecvent folosite în laboratorul de biochimie:
a) Flacon 50 ml;
b) Tuburi de tip Eppendorf;
c) Petriuri din plastic.

Petriurile din plastic, sterile, se utilizează în special pentru obținerea unor medii de cultură solide (ex: LB agar).

7. *Cuvele* se manipulează cu grijă. Nu se va atinge decât suprafața optică a cuvei! Pentru măsurători exacte cuvele trebuie să conțină cel puțin o jumătate din volumul total cu lichid. În cazul unui set de măsurători se vor citi în prima fază absorbanțele soluțiilor mai diluate, după care se continuă în ordinea crescătoare a concentrației. Cuva va fi acoperită cu „parafilm" pentru a evita evaporarea soluțiilor (fapt ce ar determina o imprecizie a măsurătorilor) și pentru a permite omogenizarea conținutului (prin inversarea acesteia de 2-3 ori). Parafilmul nu se va folosi la soluțiile care conțin solvenți organici polari (cloroform, dietil eter, acetonă). Cuvele de sticlă se spală cu o soluție de detergent 0,5%, pe o baie de ultrasunete, sunt clătite cu apă distilată și la final cu o soluție alcoolică, în scopul unei uscări mai rapide. Cuvele din plastic nu se vor spăla decât cu detergent și se vor clăti cu apă distilată.

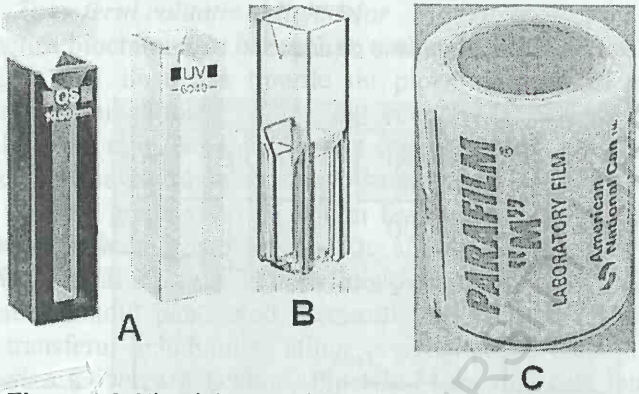


Figura 1.3. Tipuri de cuve şi folie folosită la acoperirea acestora
A – cuve cuartz; B – cuve plastic; C – parafilm

8. Spectrofotometru

Înainte de utilizarea spectrofotometrului trebuie verificate următoarele aspecte:

- Valoarea lungimii de undă;
- Poziția cuvei (astfel încât fasciculul să traverseze suprafața optică).

Se porneşte calculatorul, după care se porneşte spectrofotometrul (întrerupătorul se află în partea din spatele instrumentului lângă cablul de alimentare). Instrumentul va intra în regim în circa 10-15 min.

Pentru măsurarea la o singură lungime de undă se apasă pe icoana „Instrument control" şi se confirmă („OK") tipul de suport utilizat pentru cuve (termostat de tip Peltier), după care se procedează astfel:

- Se apasă „λ" pentru fixarea lungimii de undă dorite;
- Se apasă „Ref" pentru proba care conține soluția de referință;
- Se apasă „Read" pentru a citi absorbanța probei de analizat.

Pentru urmărirea unei reacții enzimatice se apelează icoana „Time Drive", se fixează parametrii doriți (lungime de undă, intervalul de măsurare sau temperatura de incubare).

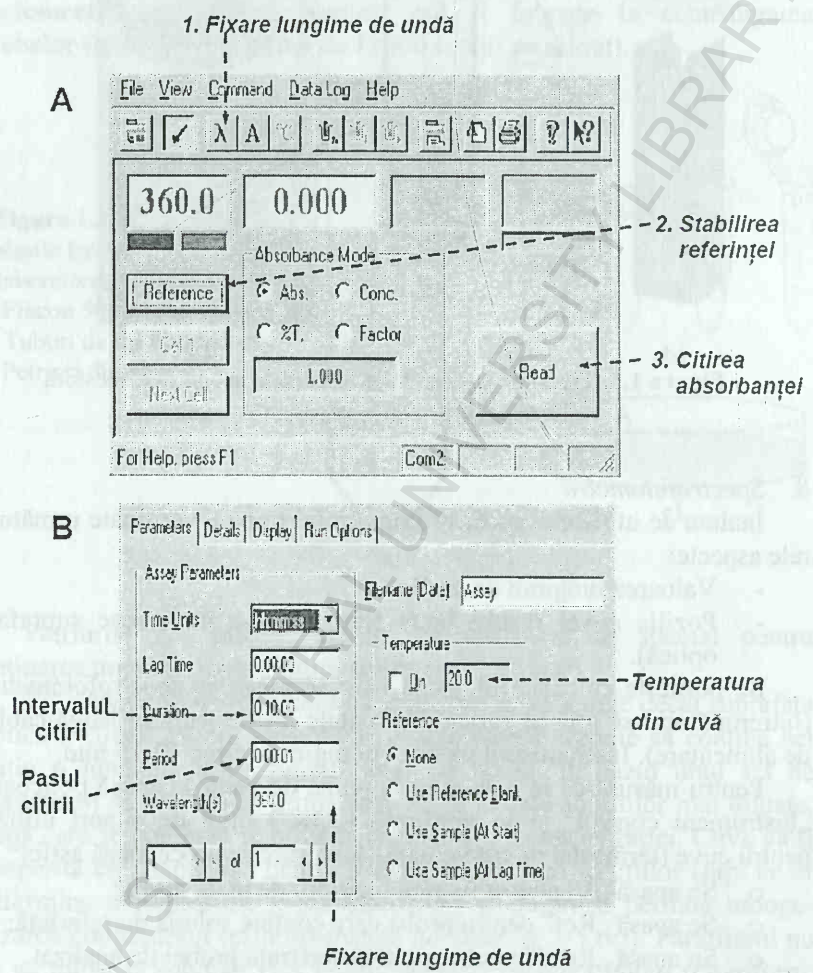


Figura 1.5. Modalități de măsurare cu ajutorul spectrofotometrului UV-VIS

A. citirea la o singură lungime de undă;
B. modificarea în timp a valorii absorbanței la aceeași lungime de undă.

9. *Transferul calitativ al lichidelor*

Practica biochimică se bazează pe multe metode analitice.

Figura 1.6. ilustrează tipurile de pipete şi adaptori utilizaţi în laboratorul de biochimie.

Bulbii mai mici din cauciuc sunt utilizaţi pentru pipetele Pasteur, pipete cu care se aspiră volume de 1-2 ml. Para din silicon este folosită pentru pipetele gradate sau cu volum fix. Trebuie evitată pătrunderea solventului în bulbul/para pipetei. De aceea, se aspiră un volum de lichid astfel încât să se depăşească linia de umplere cu circa 2-3 cm. Se eliberează lichidul până când meniscul se situează pe această linie. Pentru transferul lichidului se atinge recipientul sau paharul cu vârful pipetei şi se eliberează lichidul. Pipetele Mohr sunt cele mai frecvent utilizate în laboratorul de chimie (pentru volume între 0,1-10 ml). Pipetele serologice sunt gradate invers comparativ cu pipetele Mohr.

Curăţirea pipetelor

Imediat după utilizare pipetele sunt plasate într-un cilindru vertical şi se acoperă cu o soluţie diluată de detergent (< 0,5%). După clătire cu apă de canal se continuă cu apă distilată.

Pipetele automate

Pipetele automate sunt folosite cu vârfurile corespunzătoare.

Tabel 1.1. Tipuri de pipete automate folosite frecvent în laborator

Modelul pipetei	Volumul	Culoarea vârfului
P2	0,5-2 µl	albă
P20	2-20 µl	galbenă
P200	20-200 µl	galbenă
P1000	200-1000 µl	alb-albastră
P10000	1-10 ml	albă

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

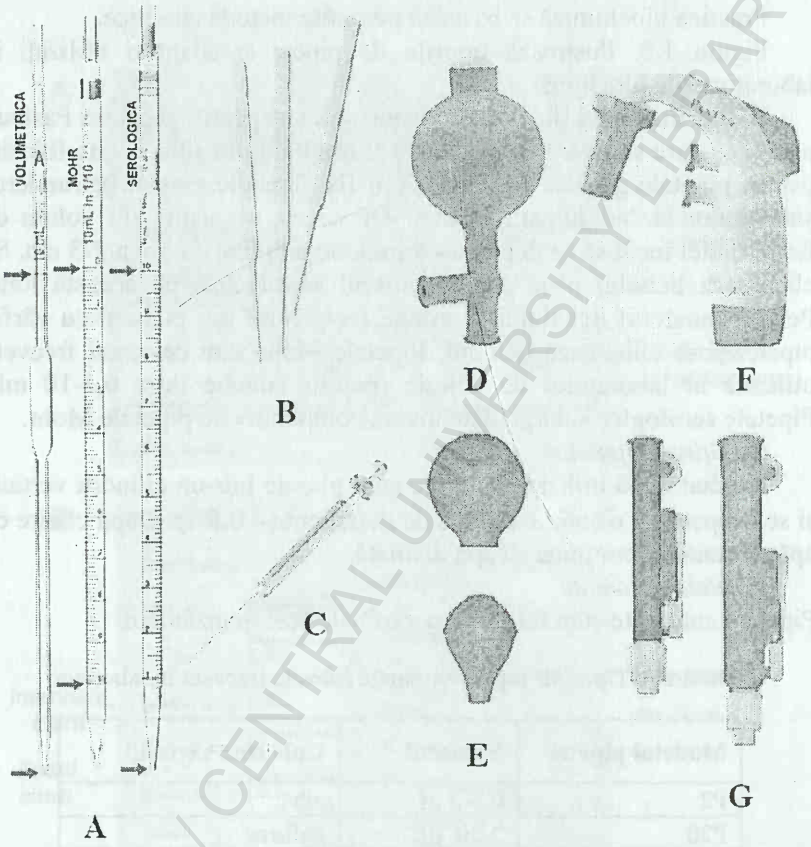


Figura 1.6. Dispozitive pentru măsurarea volumelor şi adaptorii

A. Pipete de sticlă (volumetrică, Mohr sau serologică);
B. Pipetă Pasteur;
C. Seringă Hamilton;
D. Pară pentru pipetare;
E. Bulbi pentru pipeta Pasteur;
F. şi G. Dispozitive mecanice folosite la pipetare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

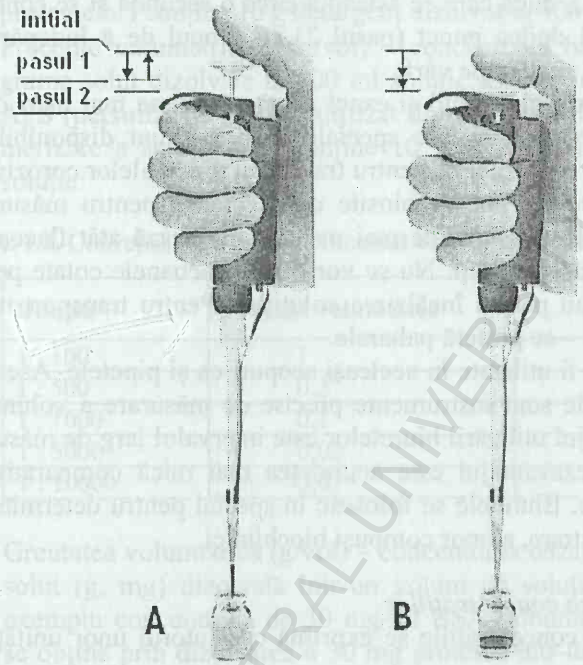


Figura 1.7. Folosirea pipetelor automate
A – Aspirarea; B – Expulzarea.

Pentru evitarea erorilor suplimentare pipetele automate se vor folosi numai în intervalul de volum indicat.

Reglarea pipetelor

Pe cadranul pipetelor apar 3 cifre, iar volumul se citeşte de sus în jos (sau de la stânga la dreapta). Cele trei cifre sunt cu negru şi/sau roşu.

În decursul pipetării se disting două etape principale:

Aspirarea – se acţionează pistonul pipetei până la primul punct (Figura 1.7, pasul 1) fără a imersa pipeta în lichid. Se imersează vârful pipetei în lichid. Se eliberează încet pistonul pentru a aspira proba.

Expulzarea – se acționează pistonul pipetei până la primul punct (analog pasului 1), după care se așteaptă circa o secundă și se continuă până la cel de-al doilea punct (pasul 2) cu scopul de a îndepărta și resturile de lichid rămase pe vârf.

În cazul transferului rapid și exact al unor volume mai mari decât 5 ml se pot folosi dispozitive speciale. Acestea sunt disponibile în diferite mărimi și sunt folosite pentru transferul materialelor corozive.

Flacoanele cotate pot fi folosite de asemenea pentru măsurarea volumelor mici. Pentru volume mai mari se utilizează atât flacoanele cotate, cât și cilindri gradați. Nu se vor folosi flacoanele cotate pentru reacții chimice sau pentru încălzirea soluțiilor. Pentru transport nu se vor folosi cilindri – se preferă paharele.

Biuretele pot fi utilizate în aceleași scopuri ca și pipetele. Asemeni pipetelor, biuretele sunt instrumente precise de măsurare a volumelor de lichid. Avantajul utilizării biuretelor este intervalul larg de măsurare al volumelor. Dezavantajul este acuratețea mai mică comparativ cu pipetele automate. Biuretele se folosesc în special pentru determinarea cantitativă, prin titrare, a unor compuși biochimici.

10. Calcularea concentrațiilor

În biochimie concentrațiile se exprimă cu ajutorul unor unități de măsură specifice:

- Molaritatea (M) – concentrația bazată pe numărul de moli solut dizolvați într-un litru de soluție.

Exemplu: o soluție de glicină 1 M ($M_{glicină}$ = 75,07) conține 1 mol de glicină sau 75,07 g glicină dizolvată într-un volum de un litru.

Conversia ordinelor de mărime se va face astfel:

$$1\ mM = 1 \times 10^{-3}\ M;\ 1\ \mu M = 1 \times 10^{-6}\ M;$$
$$1\ nM = 1 \times 10^{-9}\ M;\ 1\ pM = 1 \times 10^{-12}\ M.$$

O soluție de glicină 3 mM conține $3 \times 75{,}07 \times 10^{-3}$ g (0,2252 g) de glicină într-un volum de un litru. În situația în care se prepară un volum de 100 ml de soluție de aceeași concentrație se vor cântări la balanță 0,2252 g (225,2 mg) de glicină și se vor dilua la volumul corespunzător.

- Procentele gravimetrice (%g/g) – concentrația bazată pe numărul grame solut dizolvate în 100 g soluție. O soluție stoc de 10% SDS

(SDS – dodecil sulfatul de sodiu – detergent utilizat în electroforeza proteinelor) conține 10 g detergent dizolvat în 100 g soluție.

- Procente volumetrice (%g/vol) – concentrația bazată pe numărul grame solut dizolvate în 100 ml soluție. O soluție de 10%g/vol de APS (persulfat de amoniu-utilizat drept inițiator în reacția de polimerizare a acrilamidei) conține 10 g compus dizolvat în 100 ml soluție.

Tabel 1.2. Conversia între diluție, procentul volumetric și greutatea volumetrică

Diluția	Procent volumetric	g/l (mg/ml)
1 : 100	1	10
1 : 500	0,2	2
1 : 1000	0,1	1
1 : 5000	0,02	0,2
1 : 10000	0,01	0,1

- Greutatea volumetrică (g/vol) – concentrația bazată pe cantitatea de solut (g, mg) dizolvată într-un volum de soluție (ml sau l). De exemplu concentrația de 30 mg/ml BSA (albumina serică bovină) se obține prin dizolvarea a 30 mg proteină într-un ml (1000 µl) de soluție.

Prepararea și păstrarea soluțiilor

Solutul este cântărit pe hârtie de cântărire sau pe farfuriuțe speciale din plastic. În cazul lichidelor se vor folosi pipete dacă densitatea este cunoscută. Pentru substanțele cu vâscozitate ridicată (glicerină, PEG – polietilenglicol) se preferă cântărirea acestora înainte de prepararea soluției.

Se recomandă păstrarea soluțiilor tampon etanș, la 4 °C, pentru a evita dezvoltarea bacteriilor și a diminua degradarea reactivilor. Unele soluții trebuie depozitate sub 0 °C (soluțiile stoc de ATP, unele enzime, soluțiile de ADN, soluția de APS 10%). Soluțiile trebuie întotdeauna etichetate cu denumirea, concentrația soluției, data și numele experimentatorului.

Cântărirea

Balanțele analitice sunt dispozitivele cele mai frecvent utilizate pentru cântărirea reactivilor solizi sau lichizi (în cazul în care nu se cunoaște densitatea soluției sau soluția este vâscoasă). În biochimie, în majoritatea cazurilor se folosesc cantități reduse de reactivi și din acest motiv cântărirea trebuie să fie adecvată (de exemplu 5 mg = 0,00500 g; 40 mg =0,0400 g; 200 mg = 0,200 g). Nu se vor folosi pahare fierbinți pe balanță pentru a nu deregla sistemul mecanic al acesteia. În situația în care pe parcursul cântăririi se depun substanțe pe talerul balanței se recomandă folosirea pensulei pentru curățirea acesteia.

11. Centrifugarea

Centrifugarea este un proces care utilizează forța centrifugă pentru a separa lichidele pe baza densității materialului. De exemplu, proteinele sau acizii nucleici pot precipita în anumite soluții tampon sau organice. Aceste biomolecule pot fi sedimentate prin centrifugare. Unul dintre aspectele importante în cazul centrifugării este balansarea corespunzătoare a dispozitivului (un tub cu aceeași greutate este plasat diametral opus față de un alt tub); există însă și situații când tuburile nu se plasează diametral opus, ci simetric (trei tuburi pot fi plasate la distanțe egale). În cazul în care centrifuga nu este calibrată corespunzător există o probabilitate mare de producere a unor accidente grave. Dacă în decursul centrifugării se aude un zgomot suspect se va opri imediat centrifuga. În situația în care se va efectua centrifugarea la temperaturi scăzute (folosite în special la prepararea extractelor enzimatice) capacul centrifugei va fi închis după ce probele au fost centrifugate. În caz contrar sistemul de răcire al centrifugei poate fi afectat.

Întrebări:

1. Ce măsuri de protecție trebuie luate în cazul manipulării unei soluții de acid clorhidric? Cum neutralizați această soluție în cazul unui accident?
2. Ce tip de apă distilată se utilizează în cromatografie?

3. Cum se omogenizează conținutul din cuvele de plastic în vederea citirii absorbanței la spectrofotometru?
4. Ce tip de cuvă se folosește pentru măsurarea absorbanței la 270 nm?
5. Care din următoarele materiale de laborator este adecvat pentru măsurarea unui volum de 2 ml soluție:
   a) Pipeta Pasteur;
   b) Pipeta automată;
   c) Seringa Hamilton.
6. Care din următoarele materiale de laborator permite măsurarea cu o precizie satisfăcătoare a unor volume mai mari de soluție:
   a) Flacoanele cotate;
   b) Cilindri gradați;
   c) Biuretele.
7. Descrieți modul de preparare a 100 ml de soluție:
   a) 50 mM glicină;
   b) 1% clorură de sodiu;
   c) 10 μM citocrom c.
8. Preparați 1 ml de soluție de NaCl de concentrație 5%.
9. Cum sunt stocate soluțiile tampon? De ce?
10. Care din următoarele materialele poate fi folosit la stocarea unor volume reduse de soluție:
    a) Tuburile de 50 ml;
    b) Tuburile de 15 ml;
    c) Tuburile Eppendorf.
11. Cum procedați pentru a calibra o pipetă automată care are o capacitate maximă de 1000 μl?
12. Cântăriți la balanța analitică 20 mg de clorură de sodiu și 300 mg de sulfat de cupru. Convertiți aceste cantități în grame.
13. Cum procedați în situația în care o centrifugă trepidează la câteva secunde după ce a fost pornită? În ce situații se utilizează temperaturi scăzute în timpul centrifugării?

BCU "ALECU RUSSO" UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie:

1. Hill, Jr., R.H. şi Finster, D. (2010) Laboratory safety for Chemistry students, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
2. Coyne, G.S. (1997) The laboratory Companion: A practical guide to materials, equipment, and technique, John Wiley & Sons, NY, USA.
3. Word Health Organization (2003) Manual of basic techniques for a health laboratory, Second Edition, Geneva.
4. National Academy of Science (1995) Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals, the Courtesy of the National Academy Press, Washington, D.C.
5. Ministerul muncii şi protecţiei sociale. Departamentul protecţiei muncii (1996) Norme specifice de securitate a muncii pentru laboratoarele de analize fizico-chimice şi mecanice, Bucureşti.
6. Ministerul muncii şi protecţiei sociale (1996), Legea protecţiei muncii nr. 90/1996 şi normele metodologice de aplicare, p.43, Bucureşti.
7. Tipuri de pipete şi modul de pipetare http://www.biology.lsu.edu/introbio/tutorial/webtutorial/1208_pipet.php
8. 10 modalităţi de a îmbunătăţi tehnica de pipetare http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/a/ac/10PipetteTips.pdf
9. Cum să pipetăm corect http://www.kirkhousetrust.org/Docs/19_pipettors.pdf
10. Utilizarea micropipetelor în laborator (Universitatea Leicester) – video – http://www.youtube.com/watch?v=uEy_NGDfo_8.s

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 2

Utilizarea calculatorului în Biochimie şi Biologie moleculară

Calculatorul a devenit o unealtă indispensabilă activităţii de cercetare permiţând clarificarea unor aspecte legate de biomolecule: structura, funcţia, reacţiile în care sunt implicate acestea. Mai mult accesul la internet permite: căutarea de articole şi cărţi de specialitate, utilizarea unor software-uri pentru analiza datelor experimentale, conectarea la bazele de date care furnizează secvenţe ale acizilor nucleici şi proteinelor, structuri tridimensionale şi nu numai. După efectuarea majorităţii experimentelor se apelează la diverse programe (software-uri): Lotus 123, Excel, Sigmaplot, Quattropro, Kaleidagraph, Origin şi CricketGraph.

Există o serie de adrese Web care conţin directoare cu baze de date şi cataloage utile pentru biochimie şi biologie moleculară.
În tabelul 2.2 sunt enumerate câteva baze de date şi programe utile pentru biochimie şi biologie moleculară.

Există însă şi baze de date care permit găsirea unui compus sau a unei clase de compuşi biochimici. Aceste baze de date conţin informaţii utile referitoare la nomenclatură, proprietăţile fizice, structura tridimensională, reacţiile caracteristice, proprietăţile spectrale. Există însă şi pagini de Web care descriu o clasă de biomolecule (aminoacizii, proteinele, enzimele, lipidele, ARN-ul, carbohidraţii sau altele).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 2.1. Directoare Web care conţin directoare cu baze de date şi cataloage.

Numele	Adresa
BioResearch	http://bioresearch.ac.uk/
BioTech	http://biotech.icmb.utexas.edu/
Biology Workbench	http://biology.ncsa.uiuc.edu/
Chem Connection	http://chemconnection.com/news/journals.html
CMS Molecular Biology Resources	http://www.sdsc.edu/ResTools/cmshp.html
INFOBIOGEN Catalog of DB	http://www.infobiogen.fr/
Pedro's Biomolecular Research Tools	http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html
Protocol Online	http://www.protocol-online.net/
Survey of Molecular Biology Databases and Servers	http://www.ai.sri.com/people/mimdb/

Exerciţiu 1. Utilizaţi pagina de Web IUBMB şi manualul Worthington pentru aflarea numărului E.C. şi a proprietăţilor carboxipeptidazelor A şi B.

Soluţia 1. Carboxipeptidazele catalizează hidroliza legăturii peptidice adiacente la gruparea C-terminală a peptidelor şi proteinelor. Dacă carboxipeptidaza B (E.C. 3.4.17.2) are preferinţă pentru aminoacizii lisină sau arginină, carboxipeptidaza A (E.C. 3.4.17.1) are un spectru larg de acţiune (cu excepţia aminoacizilor aspartat, glutamat, arginină, lisină şi prolină). Au mase moleculare relative de 34-35 KDa şi un atom de zinc pe moleculă şi drept urmare pot fi inhibate de agenţii de chelatizare ai metalelor. Valoarea optimă a pH-ului pentru măsurarea activităţii este de 7,5.

Literatura biochimică

Înaintea începerii muncii de laborator cercetătorii trebuie să studieze literatura axată pe un domeniu de cercetare. Dezvoltarea părţii experimentale implică cunoaşterea unor tehnici şi procedee de laborator.

Cărţile de biochimie generală sunt importante pentru înţelegerea principiilor şi conceptelor care stau la baza acestei discipline.

Tabelul 2.2. Baze de date şi programe frecvent utilizate în biochimie şi biologie moleculară

Numele	Descrierea	Adresa
ACD/ChemSketch	Desenarea moleculelor, reacţiilor biochimice	http://www.acdlabs.com/download/
Banca de date pentru proteine (PDB)	Determinarea structurii proteinelor cu ajutorul RMN-ului sau a difracţiei cu raze X	http://www.rcsb.org/pdb/
Bancă de date pentru proteine Swiss-Protein	Secvenţierea proteinelor şi analiza acestora	http://www.expasy.ch/tools/
Baza de date cu enzime de restricţie	Modalităţi de acţiune a acestor enzime	http://rebase.neb.com/
Biocatalizatori şi biodegradare	Metabolismul microbian al unor compuşi Secvenţierea proteinelor	http://www.labmed.umn.edu/ umbbd/index.html
BiomoleculeAlive	Material educaţional	http://www.biomoleculesalive. org
BioResearch	Catalog cu resurse biochimice	http://bioresearch.ac.uk
BKChem	Program de scriere a structurilor simple	http://bkchem.zirael.org/
Centrul de informaţii pentru secvenţierea proteinelor (Munich)	Secvenţierea proteinelor	http://www.mips.biochem.mpg.de/
Centrul naţional de informaţii biotehnologice (USA)	O serie de baze de date şi resurse Utilizarea PDB-ului şi a secvenţierea ADN-ului	http://www.nlm.nih.gov/

IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numele	Descrierea	Adresa
ChemDraw	Program de desenare a moleculelor, conversie nomenclatură-structură	http://www.cambridgesoft.com
Esemble	Fragmentări molecule Hărți genetice pentru diferite organisme	http://genome.ucsc.edu/
Gene Quiz	Analiza funcției proteinelor pe baza secvenței	http://www.sander.ebi.dc.uk/ gqsrv/submit
Institutul European de Bioinformatica (EBI)	Secvențierea ADN-ului	http://www.ebi.ac.uk/
Institutul de Tehnologie din Georgia	Baze de date despre genom	http://www.tigr.com/
Institutul de cercetare al genomului	Hărți genetice pentru diferite organisme	http://www.genome.gov/11007951/
Isis Draw	Editor de formule chimice	http://www.brothersoft.com/downloads/isis-draw.html
NCBI Map Viewer	Proiect de secvențiere a genomului	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mapview/
NHGRI	Modelare moleculară avansată	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
Sisteme de modelare moleculară Predict Protein	Intuirea secvenței și a structurii proteinelor	http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/
Proiectul Genomului Uman	Baza de date despre genom	http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome
Protein Explorer	Structuri de proteine	http://www.proteinexplorer.org
Chemical Education Resource Shelf	Lista cu documente actuale din biochimie	http://www.umsl.edu/division/ artscience/chemistry/books/ welcome.html

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Numele	Descrierea	Adresa
RasMol	Program de modelare grafică a proteinelor Conţine o listă de cărţi şi software	http://www.umass.edu/microbio/rasmol/ http://jchemed.chem.wisc.edu/JCEWWW/Features/CERS/
Resurse informaţionale despre proteine	Baza de date pentru căutarea proteinelor	http://pir.georgetown.edu
UCSC	Browser pentru gene	http://genome.ucsc.edu/
VEGA	Baza de date care cuprinde informaţii legate de genomul vertebratelor	http://vega.sanger.ac.uk/

Cărţile de specialitate şi publicaţiile de tip „review"

Cărţile de biochimie generală nu oferă informaţii biochimice detaliate şi din acest motiv pentru obţinerea unor informaţii mai speciale se apelează la serii de volume şi periodice scrise de cercetătorii de renume din domeniu. Cele mai cunoscute şi mai citite publicaţii de acest gen sunt: „Annual Review of Biochemistry" (din 1932) şi „Trends in the Biochemical Science" (abreviat TIBS)

Tabelul 2.3. Exemple de cărţi care pot fi folosite pentru înţelegerea principiilor şi a conceptelor din cadrul disciplinelor de Biochimie, Biologie moleculară şi Genetică

Autor/Anul apariţiei	Titlu	Descriere
Voet, D. Voet, J. Pratt, C. W. 2006	Fundamental of Biochemistry (Ediţia a 2-a)	Prezintă o paletă largă de subiecte din domeniul biochimiei utilizând o abordare din punct de vedere chimic pentru explicarea structurii moleculelor biologice, activităţii metabolice din celulă şi a principiilor din biologia moleculară

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Autor/Anul apariției	Titlu	Descriere
Nelson, D. L. Cox, M. M 2004	Lehninger Principles of Biochemistry (Ediția a 2-a)	Aspecte de structură și cataliză. Aspecte bioenergetice și de metabolism. Noțiuni de genetică. Metabolismul acizilor nucleici și al proteinelor.
Berg, J.M. Tymocyko, J.L. Stryer, L. 2005	Biochemistry (Ediția a 5-a)	Introduce principalele clase de biomacromolecule, interconversia dintre formele de energie, sinteza macromoleculelor, procesele care stau la baza adaptării celulor la mediu înconjurător.
Smith, C., Marks, A. D., Lieberman, M. 2004	Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach (Editia a 2-a)	Conține noțiuni despre metabolismul proteinelor, acizilor nucleici și lipidelor. Descrie controlul hormonilor asupra metabolismului energetic, sinteza glicoproteinelor și a glicolipidelor, rolul proteinelor din plasmă, metabolismul sistemului nervos.
Löffler, G. 2007	Basiswissen Biochemie	Abordează principalele clase de compuși biochimici, descrie noțiuni de biologie moleculară (ADN sau genetică, ARN și expresie a genelor, biosinteza proteinelor și modificarea proteinelor). Descrie diverse procese care au loc în organele sau în lichidele biologice.
Murray, R. K., Granner, D.K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. 2003	Harper's Illustrated Biochemistry (Ediția a 26-a)	Noțiuni legate de structura și funcția proteinelor. Descrie metabolismul carbohidraților, lipidelor, proteinelor și acizilor nucleici. Cartea include și

Autor/Anul apariţiei	Titlu	Descriere
		capitole speciale (traficul intracelular şi sortarea proteinelor, xenobiotice, glicoproteine etc.)
Koolman, J., Roehm, K. H. 2005	Color Atlas of Biochemistry (Ediţia a 2-a)	Prezintă principalele clase de biomolecule, noţiuni despre metabolism, componentele celulei, noţiuni de genetică moleculară, ţesuturi şi organe. Descrie principalii nutrienţi, hormoni şi unele căi metabolice.
Metzler, D. E., 2001	Biochemistry The Chemical Reaction of Living Cells (vol 1 si 2; Ediţia a 2-a)	Noţiuni clasice de biochimie incluzând coenzimele. Introduce noţiuni de chimia mişcării, explică modalităţile de comunicare dintre celule şi exemplifică unele mecansime de apărare.
Gilberts, H. F. 2000	Basic concepts in biochemistry (Ediţia a 2-a)	Descrie structura şi funcţia proteinelor membranare, structura ADN-ului şi ARN-ului, expresia informaţiei genetice, noţiuni de cinetică enzimatică, descrie semnalele de transmitsie, diverse cicluri metabolice, transportul electronilor şi fosforilarea oxidativă, noţiuni de termodinamică şi cinetică
Creighton T.E. 1992	Proteins Structures and molecular properties	Descrie proprietăţile chimice ale polipeptidelor, biosinteza proteinelor, interacţiile fizice care determină proprietăţile proteinelor. Redă clar noţiunile de structură primară, secundară, terţiară şi cuaternară. Explică

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Autor/Anul apariției	Titlu	Descriere
		comportarea proteinelor în soluție (împachetarea) sau în membrane. Prezintă câteva noțiuni de enzimologie.
Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. 1990	Molecular Cell Biology (Ediția a 2-a)	Noțiuni de biologie moleculară. Descrie expresia genelor în procariote și eucariote, fenomenul de replicare a genelor. Abordează noțiuni despre structura celulei și funcțiile acesteia. Introduce noțiunile de cancer și imunitate.
Crocker, J., Murray, P. G. 2003	Molecular Biology in Cellular Pathology	Prezintă tehnici de blotting, citogenetică, aspecte imunologice de proliferare a celulelor. Descrie procesul de apoptoză, diverse tipuri de PCR, proiectul genomului uman, aplicații ale anticorpilor monoclonali și o introducere în proteomică.
Baxevanis, A., D., Ouellette, B. F. F. 2005	Bioinformatics, A practical guide to the analysis of genes and proteins	Inițiază cititorul în bazele de date, metode de comparare a secvențelor de ADN sau de proteină, construirea de arbori filogenetici, noțiuni de proteomică (estimarea structurii proteinelor și de complementaritate a partenerilor biochimici).
Tsai, C. S. 2002	An introduction to computational biochemistry	Analiza și managmentul datelor biochimice. Prezintă surse de pe internet, modalități de vizualizare a biomoleculelor și a interacțiilor biochimice, noțiuni de proteomică și genomică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Autor/Anul apariţiei	Titlu	Descriere
Wenk, M. R., Fernandis, A. Z. F., 2007	A manual for biochemistry protocols	Un manual cu experimente uzuale din laboratorul de biochimie alături de aspecte fundamentale pentru înţelegerea noţiunilor pe care se bazează metodologia.
Bettelheim, A. F., Landesberg, J. 2000	Laboratory Experiments for General, Organic and Biochemistry	Descrie reacţiile de identificare a carbohidraţilor, săpunurilor, modalităţile de analiză a lipidelor şi vitaminei C, respectiv o modalitate de izolare a ADN-ului din drojdie.
Strong, F. M., Koch, G. H 1974.	Biochemistry laboratory manual (Ediţia a2-a)	Descrie experimentele care permit caracterizarea unor carbohidraţi, lipide, proteine, acizilor nucleici, vitaminelor sau enzimelor.

Jurnalele constituie o parte esenţială a literaturii de specialitate. Acest tip de publicaţie poate să apară atât în forma scrisă cât şi electronică. Unul dintre criteriile de selecţie al jurnalelor biochimice este acela care se bazează pe numărul de citări primite de publicaţiile respective. În funcţie de acest criteriu cele mai citate jurnale sunt: „Journal of Biological Chemistry" (JBC), „Biochemica et Biophysica Acta" (BBA), „Biochemistry", „Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America" (PNAS), „Biochemical Journal, European Journal of Biochemistry" (EJB) şi „Biochemical and Biophysical Research Communications" (BBRC).

Referinţele care acoperă metodologia sunt publicaţiile specializate pentru descrierea metodelor şi tehnicilor noi. Dintre acestea cele mai cunoscute sunt: „Analytical Biochemistry", „Biochemical Preparation" (volum cu apariţie anuală), „Current Protocols in Molecular Biology" (Ed. P. Ausabel şi colaboratorii; un manual cu tehnici de lucru), „Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" (Ed. T.S. Work şi R.G. Burdon; fiecare volum acoperă un domeniu din

biochimie), „Methods in Enzymology" (peste 250 de volume, fiecare volum se focusează pe o serie de tehnici biochimice), „Methods of Enzymatic Analysis" (Ed. H. Bergmeyer; volume care conțin tehnici de purificare ale enzimelor și descriu modalitățile de caracterizare a acestora), „A practical Guide of Molecular Cloning", 2nd ed., B. Perbal și „Molecular Cloning. A laboratory manual" (Sambrook și Russell, 3th ed., 3 volume – conțin aspecte legate de izolarea ADN-ului, tehnica PCR, electroforeză etc).

Cărți cu date chimice și biochimice

În decursul laboratorului de chimie studenții au nevoie de o serie de informații (fizice, chimice și biochimice). Aceste informații pot fi găsite într-o serie de colecții de date biochimice: „Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology", 2nd ed, J. Stenesh (1989) – Wiley Interscience (New York), „Glossary of Biochemistry and Molecular Biology", D. Glick (1990) – Raven Press (New York), „Merck Index", S. Budavari, Ed., Merck and Co, „Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", G. Frasman, Ed. (1989), CRC Press (Boca Raton, FL) (sursă de date chimice și fizice despre acizii nucleici, proteine, lipide și carbohidrați), „Worthington Enzyme Manual", 2nd ed. C. Worthington, Ed. (1988) – Worthington Biochemical Corp. (Freehold, NJ) (conține informații despre peste 75 de enzime).

Folosirea internetului în biochimie

Două publicații („Chemical Abstract" și „Biological Abstract") oferă informații sumare despre articolele, sintezele sau patentele care apar în cele două domenii. În cazul științelor vieții există o publicație săptămânală, „Current Content" (valabilă și în format electronic) care este utilă pentru biochimiști. STN International constituie un sistem (rețea de informații) care permite accesul la articole, sinteze sau patente în biologie și biomedicină, chimie („Chemical Abstract") sau biomedicină (*MEDLINE* sau *PubMed* construit de Biblioteca Națională de Medicină din SUA poate fi vizualizat la adresa http://www.nlm.nih.gov/ și *MEDLARS*). Una dintre cele mai frecvent utilizate interfețe pentru obținerea de informații din bazele de date biochimice este sistemul *NCBI Entrez*. Acest portal pune în legătură informațiile

individuale care apar într-o serie de baze de date publice. De exemplu, un articol care apare în Medline (sau Pubmed) poate descrie informaţii referitoare la o genă a cărei secvenţă se află în *GenBank*. Secvenţa de nucleotide, la rândul său, poate coda o proteină (produsă în urma translaţiei) a cărei secvenţă este existentă într-o bază de date pentru proteine. Entrez poate oferi şi informaţii despre structura terţiară a proteinelor şi localizarea genelor într-un anumit cromozom. Există baze de date (*NCBI MapViewer, USCS Genome Browser, Esemble*) care permit accesul la hărţi genetice pentru diferite organisme. Studiile care compară genomul diferitelor organisme permit identificarea regiunilor care se conservă de-a lungul evoluţiei. Odată cu elucidarea genomului unui număr larg de organisme s-au dezvoltat şi o serie de metode comparative de „deducere" a genelor. Raţionamentul care stă la baza acestor metode este acela că regiunile funcţionale (care codează proteinele) au tendinţa de a fi mai conservate decât celelalte regiuni (care nu codează proteinele). Această caracteristică poate fi fructificată la identificarea regiunilor care codează proteinele din genomul care este studiat. Pentru compararea genelor din cadrul aceluiaşi genom (uman sau şoarece) sunt utilizate programele de analiză TWIN-SCAN (http://genes.cs.wustl.edu) şi SLAM (http://baboon.math.Berkley.edu/~syntenic/slam.html).

Structura secundară a ARN-ului poate fi intuită prin intermediul unor programe de minimizare a energiei libere. Cele mai cunoscute software-uri sunt *Mfold* şi *Vienna Package*. Există şi metode care apelează la alinierea secvenţelor (*ConStruct* şi *PFold*) pentru a uşura prevederile referitoare la structura secundară (vezi tabelul 2.4).

Prima bază de date electronică care a avut în vedere stocarea informaţiilor referitoare la structura tridimensională a proteinelor a fost Protein Data Bank (PDB). Această bază de date conţine mai mult de 20.000 de structuri 3D care au fost determinate experimental.

Există o serie de pachete de vizualizare a structurii tridimensionale a proteinelor. Cele mai cunoscute dintre acestea sunt VRML, Protein Explorer, RasMol, Swiss/PDB/Viewer sau MICE, Quick PDB. PDB oferă şi un număr de imagini care pot fi modificate în funcţie de preferinţele utilizatorului.

Tabelul 2.4. Pachete de software utilizate la determinarea structurii secundare a ARN-ului

Numele	Descrierea	Adresa
Mfold Vienna RNA package	Permit prezicerea structurii secundare a ARN-ului	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/
ConStruct Pfold server FOLDALIGN server	Permit prezicerea structurii secundare comune prin compararea unor secvențe multiple ale ARN-ului	http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/loca/ConStruct.html http://www.daimi.au.dk/~compbio/rnafold/ http://www.bioinf.au.dk/FOLDALIGN/

Similaritățile structurale dintre proteine (la care diferențele dintre structurile primare sunt relativ mari) pot fi puse în evidență prin utilizarea pachetelor CATH, SCOP, VAST sau CE.

Exercițiu 2. Utilizați pagina de Web Pubmed pentru a căuta informații referitoare la boala Alzheimer (*engl.* Alzheimer's disease). Apăsarea butonului „Search" va conduce la aproximativ 63.486 referințe bibliografice sau articole. Introducerea unei expresii cheie suplimentare, de exemplu distrugerea mitocondriei (*engl.* mitochondria demage) va restricționa căutarea și conduce la un număr mai mic (69) de articole. Dacă se apasă pe autori se poate obține rezumatul publicației de interes. În cazul în care se dorește o trecere în revista a cercetărilor similare în domeniu se folosește opțiunea „see Related Articles".

Laboratoarele virtuale de biochimie constituie o alternativă care are drept scop familiarizarea studenților cu activitatea de laborator, în special în cazul în care se lucrează cu reactivi și echipamente ale căror prețuri sunt foarte ridicate. Dezavantajul constă în faptul că aceste laboratoare virtuale nu pot fi considerate întotdeauna cea mai bună

alternativă la varianta practică, iar avantajul este acela de a familiariza studenţii cu tehnicile de laborator înainte de a implica aceste persoane în activitatea de laborator, în special în situaţiile în care aceştia vor folosi tehnici şi reactivi ce impun o atenţie deosebită din partea experimentatorului.

Tabelul 2.5. Laboratoare virtuale de biochimie

Numele	Descrierea	Adresa
Biointeractive Virtual Lab, Howard Hughes Medical Institute	Laboratoare de imunologie, identificarea bacteriilor, cardiologie, neurofiziologie şi insecte transgenice	http://www.biointeractive.org/
BioResearch	Catalog cu informaţii asupra unor metode de laborator şi a unor materiale pentru învăţarea biochimiei	http://bioresearch.ac.uk/
Genetic Science Learning Center University of Utah	Extracţia ADN-ului, tehnica PCR, electroforeza, folosirea biocipurilor	http://learn.genetics.utah.edu/
Lab3D, University of Virginia	Titrarea aminoacizilor, electroforeză şi cinetică enzimatică	http://lab3d.chem.virginia.edu/
The Virtual Biochemistry Lab	Experimente în cromatografie, electroforeză, RMN, secvenţiere şi împachetare a proteinelor	http://www.nobel.se/

Probleme:

1. Utilizaţi internetul pentru a identifica şi a ordona cronologic laureaţii premiului Nobel în Biochimie şi punctaţi contribuţiile acestora în acest domeniu.
2. Utilizaţi PubMed şi PDB pentru a obţine următoarele informaţii despre enzima urează:
   a) Numărul de articole accesibile integral;
   b) Structura tridimensională a ureazei din diferite surse;

c) Identificarea cofactorului enzimatic.

3. Detecția sarcinii se face prin intermediul unor anticorpi. Găsiți 2-3 referințe bibliografice cu teste asemănătoare publicate în ultimele luni.
4. Folosind PubMed scrieți structura primară a albuminei serice umane. Din ce motive primul aminoacid din secvența este metionina? Câte resturi de triptofan se găsesc în această proteină?
5. Utilizați aplicația T-Coffee (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/) pentru compararea secvențelor de nucleotide (sau de aminoacizi) în scopul determinării similarităților dintre albumina umană serică și albumina bovină.
6. Utilizați programul *Swiss-PdbViewer* pentru studiul structurii tridimensionale a proteinei mioglobină.
7. Utilizați aplicația *Protein Digest* pentru clivarea teoretică a BSA-ului de către tripsină sau de un amestec compus din trei enzime (elastază, tripsină și chimotripsină)
8. Folosind aplicația *NEBcutter V2.0* determinați situsurile de scindare și enzimele de restricție în cazul plasmizilor pUC 19 și pGLO. În care dintre cele două situații poate interveni enzima de restricție EcoRV?

Bibliografie:

1. Currell, G. & Downman, A. (2006) Essential Mathematics and Statistics for Science, Wiley.
2. Bourg, D.M., O'Reilly Excel Scientific and Engineering Cookbook (2006), CHM.
3. Misener, S. & Krawetz, S. (2000), Bioinformatics: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ.
4. Claverie, J.-M. & Notredame, C. (2006), Bioinformatics for dummies (2nd edition), Wiley, Hoboken, NJ.
5. HU, X. & Pan, Y. (2007), Knowledge discovery in bioinformatics: Techniques, Methods and Applications, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
6. Barnes, M. (2007), Informatics For Geneticists: A bioinformatic primer for the analysis of genetic data, John Wiley & Sons, New York.

7. Higgins, D. & Taylor, W. (2000), Bioinformatics: Sequence, Structure and Databank, Oxford University Press, Oxford.
8. Andreas, D.B. & Ouellette, B.F.F. (Ed) (2005), Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
9. Deonier, R.C. et al. (2005), Computational Genome analysis: an introduction, Springer.
10. Clote, P. & Backofen, R. (2001), Computational Molecular Biology: An introduction, Wiley, Hoboken, New Jersey.
11. Tsai, C. (2002), Computational Biochemistry, Wiley-Liss, New York.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 3

Tehnici de bază în biochimia experimentală

3.1. Alegerea soluției tampon în biochimie

Mediul natural în care se află compușii biochimici (intracelular sau extracelular) are valori de pH bine definite. Majoritatea soluțiilor utilizate în biochimie sunt soluții tampon în intervalul de pH 6-8, dar există și situații când pH-ul soluției are valori mai mici (de exemplu activitatea pepsinei este optimă în intervalul 1,5-2) sau mai mari (pH-ul optim al lizozomei este 9,2).

Există câteva criterii de selecție a soluției tampon utilizate în biochimie:

a) valoarea pKa a tamponului trebuie să se situeze într-un interval de pH apropiat condițiilor de lucru (pKa ± 1);
b) capacitatea de tamponare a tamponului trebuie să fie acceptabilă;
c) soluția tampon nu reacționează cu celelalte molecule.

Cele mai utilizate soluții tampon sunt acetat, fosfat, Tris, trietanolamină, HEPES, PIPES și MOPS. Tamponul fosfat are o capacitate de tamponare mare și este utilizat în intervalul de pH 6,5-7,5, dar are și dezavantajul de a lega cationii bivalenți (Ca^{2+}, Mg^{2+}) și de a inhiba unele enzime (vezi figura 3.1).

Good și colaboratorii au utilizat soluții tampon zwitterionice (Tris, HEPES, PIPES). Cel mai utilizat tampon este Tris (tri-(hidroximetil)-aminometan). Soluțiile tampon pe baza acizilor carboxilici (acetat, formiat, citrat și succinat) sunt de regulă utilizate la pH acid (3-6).

Tamponul borat este folosit la pH alcalin (pH = 8,5-10), dar are dezavantajul formării de complecşi cu zaharurile. Există situaţii în care se utilizează soluţii de aminoacizi pentru tamponare (glicina la pH 2-3 sau 9,5-10,5; histidina la pH 5,5-6,5; glicin amida la pH 7,8-8,8 şi glicil-glicina la pH 8-9). Deşi aceste soluţii tampon conferă un mediu de tamponare similar cu cel din celulă, acestea pot interfera cu unele procese biologice.

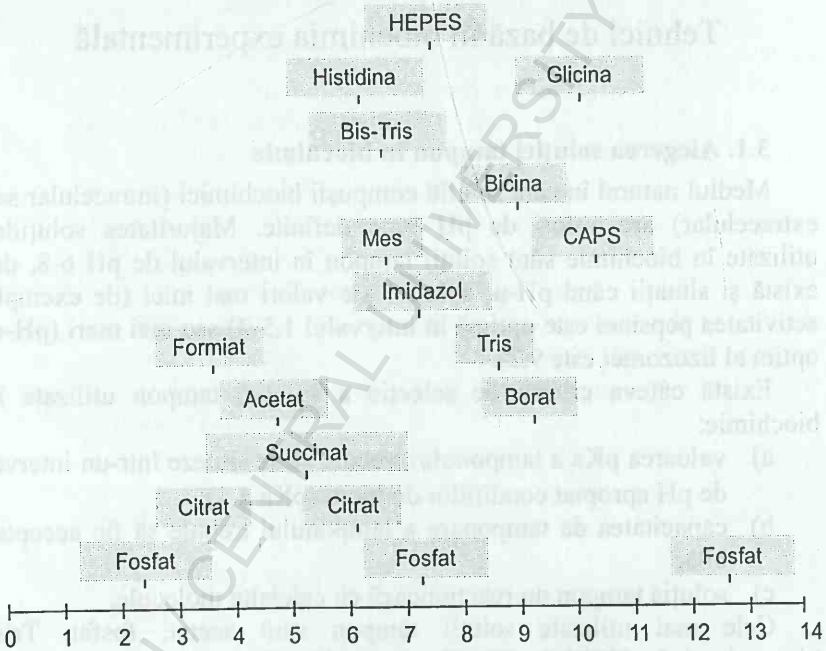


Figura 3.1. Capacitatea de tamponare a soluţiilor tampon

Probleme

1. Preparaţi o soluţie tampon fosfat cu pH-ul =7 folosind K_2HPO_4, acid clorhidric concentrat şi un pH-metru.
2. Descrieţi cum preparaţi o soluţie de acetat de sodiu 50 mM cu pH = 5.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Preparați o soluție stoc de HEPES 100 mM. Diluați soluția stoc pentru a obține o concentrație de 20 mM. În ce interval de pH capacitatea de tamponare a HEPES-ului este optimă?
4. Cum preparați 1 litru de soluție de borat de sodiu 5 mM plecând de la tetraborat de sodiu?

3.2. Metode de estimare a concentrației proteinelor

Studiile biochimice necesită măsurarea cantitativă a concentrației proteinelor în soluție. În funcție de compoziția diferită a proteinelor se apelează la diverse metode de cuantificare a acestora.

3.2.1. Metoda biuretului și metoda Lowry

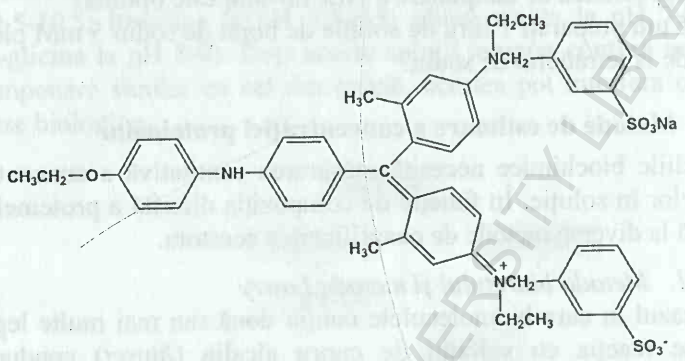
În cazul în care biomoleculele conțin două sau mai multe legături peptidice reacția cu sulfatul de cupru alcalin (*biuret*) conduce la formarea unui complex purpuriu (atomii de azot din legătura peptidică coordinează ionii de Cu^{2+}, complexul prezintă un coeficient de extincție maximă la 540 nm). Cantitatea de produs format (după o incubare de 20-30 min) este influențată de concentrația proteinei. În laborator, se impune construirea unei curbe de calibrare cu o proteină standard (albumina serică). Concentrația proteinei de interes se extrapolează din curba de calibrare. Metoda biuretului are dezavantajul unei sensibilități reduse (1-20 mg).

Metoda Lowry a fost una dintre cele mai folosite metode la stabilirea concentrației de proteină. Culoarea albastră rezultă în urma complexării legăturii peptidice cu sulfatul de cupru alcalin (reacția biuretului) și a reducerii reactivului Folin-Ciocâlteu (fosfomolibdat-fosfotungstat) de către resturile de tirozină și triptofan din proteină. Metoda are o sensibilitate cu două ordine de magnitudine mai mare decât cea a biuretului (5-100 μg/ml). Dezavantajele metodei sunt: interferența cu diverse substanțe (lipide, detergenți), timp relativ ridicat de reacție (20-30 min) și denaturarea ireversibilă a proteinelor.

3.2.2. Testul Bradford

Dezavantajele metodei Lowry au impus găsirea unei metode noi de cuantificare a concentrației proteinelor din soluție. Metoda Bradford se

bazează pe capacitatea proteinelor de a lega un colorant (Coomassie Brilliant Blue G-250 sau Serva Blue G).



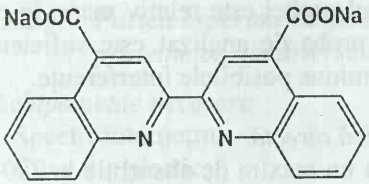
Schema 3.2. Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blue G)

Legarea colorantului Coomasie Brilliant Blue la proteină în condiții acide determină o deplasare a maximului de absorbție (λ_{max}) de la 465 la 595 nm. Absorbția la 595 nm este proporțională cu concentrația proteinei. În comparație cu metoda Lowry această metodă utilizează numai un singur reactiv, o soluție acidă de Coomasie Brilliant Blue G-250.

Metoda Bradford poate fi utilizată pentru determinarea concentrației proteinelor în intervalul 1-20 μg. Timpul scurt de apariție al culorii (2-5 min) respectiv puținele interferențe (datorate detergenților) au determinat utilizarea frecventă a acestei metode pentru determinarea concentrației proteinelor.

3.2.3. Testul cu acid bicinconinic

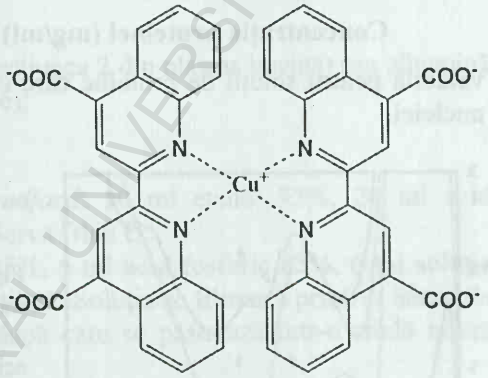
Reacția cu acidul bicinconinic (ABC) este frecvent utilizată datorită sensibilității mari, liniarității pe un domeniu larg de concentrație, compatibilității cu detergenți (Triton sau SDS până la concentrații de 1%) și o gamă largă de soluții tampon. Dezavantajele: timpi lungi de incubare și incompatibilitate cu agenții reducători utilizați la solubilizarea proteinei.



Acidul bicinconinic (ABC)

1) Cu^{2+} —(+ Proteina / HO^-)→ Cu^+

2) Cu^+ + ABC ⟶



Complex purpuriu
(λ_{max} = 562 nm)

Schema 3.3. Structura acidului bicinconinic (ABC) şi reacţiile de culoare care stau la baza metodei de detecţie a proteinelor cu ABC

Reacţia se bazează pe reducerea Cu^{2+} la Cu^+ de către proteină în condiţii alcaline (reacţia biuretului). Ionul cupros format în urma reacţiei de reducere este complexat de 2 molecule de ABC. Complexul este un produs purpuriu (schema 3.3) care prezintă absorbţia maximă la 562 nm. Formarea culorii este pusă pe seama structurii macromoleculare a proteinei, numărul de legături peptidice existente şi prezenţa unor aminoacizi specifici (cisteina, triptofan şi tirozina).

Există şi situaţii în care intervin interferenţele reactivilor prezenţi în soluţie. Lipidele, agenţii cu sulf şi EDTA-ul (agent de chelatare al Cu^{2+})

BCU "I. CENTRA" UNIVERSITY LIBRARY

interferează în cazul în care volumul probei este relativ mare. În cazul în care concentrația proteinei din proba de analizat este suficient de mare se preferă o diluție pentru a diminua posibilele interferențe.

3.2.4. Metoda spectrofotometrică directă

Majoritatea proteinelor prezintă un maxim de absorbție la 280 nm, datorită prezenței aminoacizilor tirosina și triptofan. În extractele celulare, prezența acizilor nucleici (cu un maxim de absorbție la 260 nm) a impus găsirea unor metode de corecție a interferențelor aduse de acești compuși. Layne (1975) a propus ecuația următoare:

$$\textbf{Concentrația proteinei (mg/ml)} = 1{,}55\ A_{280} - 0{,}76\ A_{260}$$

valabilă pentru soluții de proteine care conțin mai puțin de 20% acizi nucleici.

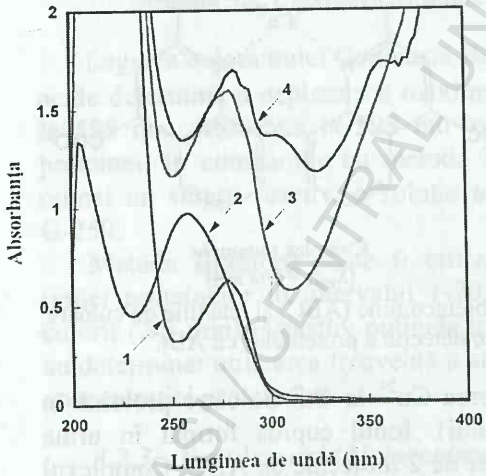


Figura 3.4. Caracteristicile spectrale ale proteinelor (1, 3 și 4; concentrația finală 1 mg/ml) și ale acidului nucleic (ADN-ul din semen de hering 0,23 mg/ml)
1 – albumină serica bovină;
2 – ADN (semen de hering);
3 – mioglobina cabalină;
4 – citocrom c.

Scopes (1974) a propus o metodă de determinare a concentrației proteinelor utilizând raportul A_{280}/A_{205}. Aminoacizii triptofan, tirosina, fenilalanina și histidina absorb considerabil în intervalul 250-280 nm (Figura 3.4.). Aminoacizii arginina, metionina și cisteina au un coeficient de extincție mai slab la aceeași lungime de undă. Formula propusă de Scopes este: $A_{205}/c_{\text{proteină}}$ (mg/ml) = **27,0 +120** (A_{280}/A_{205})

3.2.5. *Partea experimentală: Determinarea concentrației proteinelor din diverse surse*

A. Echipamente necesare

– Spectrofotometru;
– Cuve din plastic;
– Pipete Pasteur;
– Tuburi Eppendorf;
– Vortex.

B. Reactivi

– Colorantul Serva Blue G;
– Soluție de γ-globulină (fracțiunea 2 din plasma bovină) sau albumină serică (1-2 mg/ml soluție);
– Etanol 95%;
– Acid fosforic 85%.
– *Soluție concentrată Bradford*: 10 ml etanol 95%, 20 ml acid fosforic 85% și 35 mg Serva Blue G.
– *Soluția 1*: 3 ml etanol 95%, 6 ml acid fosforic 85%, 6 ml soluție Bradford, 85 ml apă distilată. Soluția se filtrează printr-o hârtie de filtru Whatman No 1 după care se păstrează într-o sticlă brună pentru câteva săptămâni.
– *Soluția 2:* 0,1 g bicinconinat de sodiu, 2 g carbonat de sodiu, 0.16 g tartrat de sodiu, 0,4 g NaOH, 0,95 g bicarbonat de sodiu se dizolvă în 70-80 ml apă. Se ajustează pH-ul la valoarea 11,25 cu bicarbonat de sodiu sau NaOH. Se transvazează soluția într-un flacon cotat de 100 ml și se completează până la semn cu apă.
– *Soluția 3:* 0,4 g sulfat de cupru dizolvat în 10 ml apă;
– *Soluție ABC*: Se amestecă 50 ml soluție 2 cu 1 ml soluție 1. Se obține o soluție de culoare verde care este stabilă timp de o săptămână la temperatura camerei.

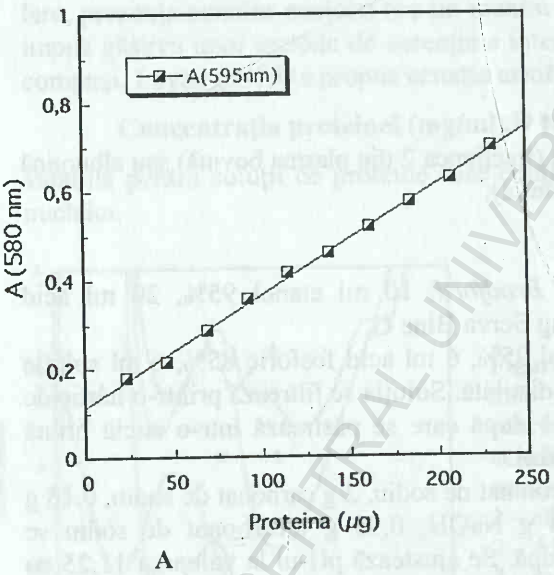
C. *Protocol*

Modul de lucru (Metoda Bradford) Se pipetează soluția de analizat (maxim 100 µl) într-un tub Eppendorf. Pentru diluții (pentru standard se pipetează 1-10 µl soluție de proteină iar pentru proba de analizat, de exemplu ser sangvin, se pipetează 1-5 µl soluție diluată 1:20) se

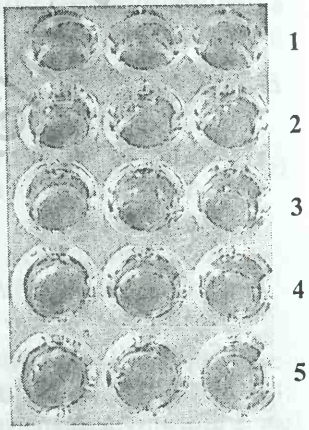
BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

completează volumul de probă cu soluția tampon (NaPi 0,1M pH = 7,5) până la volumul de 100 µl. Se adaugă 1 ml din *soluția 1* și se agită amestecul. Se citește valoarea absorbanței la 595 nm după 5 min (incubarea poate fi prelungită până la maxim 1 h, Bearden, 1978).

Cu ajutorul curbei de calibrare se estimează concentrația soluției de proteină (sau concentrația totală a proteinelor dintr-un extract).



A



B

Figura 3.5. A. Curba standard de calibrare pentru testul Bradford în care concentrația proteinelor purificate sau concentrația totală a amestecurilor de proteine poate fi estimată prin extrapolare utilizând o proteină standard (γ-globulina bovină). Legarea colorantului Serva Blue G de proteine determină formarea unui complex caracterizat printr-un maxim de absorbție la 595 nm.

B. Influența concentrației proteinei asupra intensității culorii atribuită complexului proteină-colorant unde:

linia 1 – tampon (NaPi 0.1M pH 7,6); linia 2 – 0,2 µg proteină; linia 3 – 0,6 µg proteină; linia 4 – 2 µg proteină; linia 5 – 5 µg proteină.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modul de lucru (Metoda cu ABC)

Se prepară o soluție de albumină serică bovină, BSA, de concentrație 1 mg/ml în apă bidistilată. Se diluează soluția inițială 1:10 și se obține o soluție standard de 0,1 mg/ml în apă bidistilată.

Se pipetează în 5 tuburi Eppendorf 0, 20, 50, 100 µl soluție BSA 0,1 mg/ml. Proba se pipetează (5 µl) într-un tub separat (tubul 6). În tuburi se adaugă soluția de ABC până la un volum de 500 µl și se completează cu 500 µl de apă distilată. Se omogenizează tuburile cu ajutorul unui Vortex după care se incubează la 60-65 °C pentru 1 h. După răcirea probelor se citește absorbanța la 562 nm, începând cu proba oarbă. Se trasează dependența A_{562} în funcție de absorbanța citită.

Probleme

1. Folosind metoda Bradford estimați concentrația totală a proteinelor din următoarele surse: ser sanguin, albuș de ou, gălbenuș de ou sau salivă.
2. O soluție de BSA de concentrație 0,1 mg/ml este folosită pentru trasarea curbei standard în scopul determinării concentrației de proteină dintr-o probă cu ajutorul reactivului Bradford. Valoarea absorbției înregistrată la 595 nm pentru 1 ml de soluție de analizat, diluată 1:10 a fost de 0,35. Calculați concentrația totală a proteinelor din soluția de analizat.
3. Din ce motive se preferă estimarea concentrației proteinelor prin metoda Bradford în defavoarea metodei biuretului?
4. Ce aminoacizi din constituția proteinelor prezintă absorbție în intervalul 260-280 nm?

3.3. Metode de estimare a concentrației acizilor nucleici

Absorbția în UV a acizilor nucleici

În cazul tehnicii PCR (vezi capitolul 4.6) este necesară determinarea exactă a concentrației ADN-ului. Una din cele mai simple metode de estimare a concentrației acizilor nucleici se bazează pe proprietatea acestora de a absorbi lumina din domeniul ultraviolet la o lungime de undă maximă de 260 nm, absorbție care este atribuită nucleelor aromatice prezente în bazele purină și pirimidină. În general pentru o concentrație de

50 μg/ml ADN dublu catenar valoarea absorbanței la 260 nm este egală cu unitatea, iar în cazul ADN-ului și ARN-ului monocatenar aceeași valoare a absorbanței este echivalentă cu o concentrație de 40 μg/ml.

Determinarea concentrației acizilor nucleici prin fluorescență

Complexul ADN-bisbenzimidazol emite mai puternic (intensitate de 5 ori mai mare la 458 nm) decât bisbenzimidazolul în stare liberă. Tehnica poate fi cu două ordine de magnitudine mai sensibilă (în domeniul 0,01 – 5 μg/ml) comparativ cu detecția în UV.

O altă modalitate de detecție a ADN-ului sau ARN-ului se bazează pe interacțiunea dintre aceşti polimeri și *bromura de etidiu*. În urma formării complexului acid nucleic-bromură de etidiu intensitatea emisiei (la 590 nm) crește de aproximativ 25 de ori. Probele de acid nucleic sunt pipetate în godeuri cu agaroză ce conțin 1% bromură de etidiu. Aceasta metodă are sensibilitate mai mare (1-10 ng/ml) comparativ cu prima metodă menționată.

Acridin orange este un agent fluorescent folosit în microscopie. Acest compus interacționează cu ADN-ul sau ARN-ul prin intercalare între lanțurile acestor macromolecule sau prin interacțiuni electrostatice. Complexul acridin orange-ADN se distinge printr-un maxim de absorbție la 502 nm și un maxim de emisie la 525 nm (verde). Prin asocierea agentului fluorescent cu ARN-ul maximul de absorbție se deplasează la 460 nm, iar maximul de emisie este deplasat la 650 nm (roșu).

DAPI (4,6'-diamino-2-fenilindolul) este un compus fluorescent care se leagă în adâncitura mare a ADN-ului. Acest reactiv este des folosit în microscopia de fluorescență. Dat fiind faptul că DAPI poate trece prin membrana celulară acest compus poate fi folosit pentru etichetarea celulelor. În cazul în care este utilizat pentru microscopia de fluorescență DAPI poate fi excitat în domeniul UV. Complexul DAPI-ADN dublu catenar este caracterizat printr-un maxim de absorbție la 358 nm și un maxim de emisie la 461 nm (banda largă). În cazul ARN-ului complexul emite la 400 nm. Datorită fluorescenței albastre a DAPI acest agent poate fi folosit în analizele complexe, caz în care pot fi depistați și alți compuși cu fluorescență verde sau roșie. Alături de etichetarea nucleelor celulelor, DAPI poate fi utilizat pentru detecția ADN-ului viral din culturile de celule.

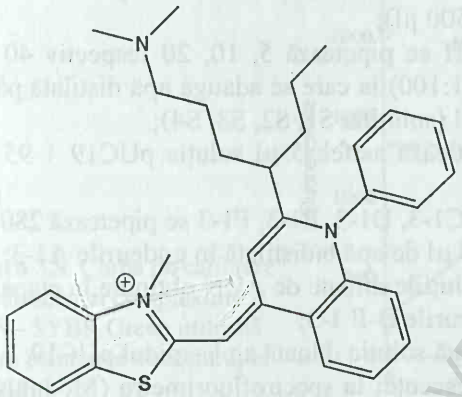


Figura 3.6. SYBR Green I (N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-iliden)metil]-1-fenilquinolin-1-iu-2-il]-N-propilpropan-1,3-diamina)

SYBR Green este un compus fluorescent mai nou utilizat la detecția acizilor nucleici în soluție, în aplicațiile pe biocipuri sau în citometria în flux. SYBR Green este de 25 de ori mai sensibil decât bromura de etidiu (utilizată mai rar datorită riscului apariției unor mutații genetice). SYBR Green se leagă preferențial de ADN-ul duplex (în adâncitura mică a duplexului), complexul absoarbe lumina albastră la 488 nm și emite lumina verde la 522 nm, dar poate lega și ADN-ul monocatenar proces în urma căruia creșterea fluorescenței este mai puțin pronunțată.

Estimarea concentrației plasmidului pUC19 prin fluorescență

Soluții

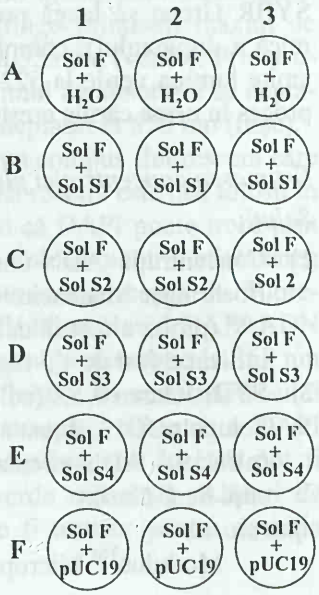
1) Concentrația ADN-ului (pulbere liofilizată din semen de hering, Boehringer Mannheim GmbH) standard a fost măsurată în domeniul UV (proba a fost diluată 1:50, A_{260} = 0,6). Concentrația standardului utilizat a fost de 1,5 mg/ml.
2) SYBR Green 0,5X (soluție F) în tampon PBS;
3) Soluție pUC19 obținută cu ajutorul unui kit de separare a plasmizilor (pUC19 – ADN circular folosit drept control în transformarea unor suşe de *E Coli*).

Aparatura:

Modulus™ Microplate Multimode Reader

Modul de lucru

1) Soluția de ADN se diluează 1:100 (5 µl ADN în apă bidistilată; volumul final al soluției 500 µl);
2) În patru tuburi Eppendorf se pipetează 5, 10, 20 respectiv 40 µl soluție diluată de ADN (1:100) la care se adaugă apă distilată până la volumul final de 100 µl (soluțiile S1, S2, S3, S4);
3) Soluția de pUC19 se diluează astfel: 5 µl soluție pUC19 + 95 µl apă bidistilată;
4) În godeurile A1-3, B1-3, C1-3, D1-3, E1-3, F1-3 se pipetează 280 µl soluție F; Se pipetează 20 µl de apă bidistilată în godeurile A1-3;
5) Se pipetează 20 µl din soluțiile diluate de ADN obținute în etapa 2) (vezi schema 3.7) în godeurile B-E 1-3;
6) În godeurile F1-3 se adaugă soluția diluată a plasmidul pUC19;
7) Se citește valoarea fluorescenței la spectrofluorimetru (Modulus™ Microplate Multimode Reader) utilizând kitul pentru excitare în albastru (λ_{ex} = 490 nm; λ_{em} = 510-570 nm);
8) Se estimează concentrația plasmidul pUC19 (de ordinul µg/ml) prin extrapolare.



Schema 3.7. Reprezentarea schematică a ordinii de pipetare în godeuri în scopul măsurării creșterii fluorescenței complexului ADN-SYBR Green la creșterea concentrației ADN-ului.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

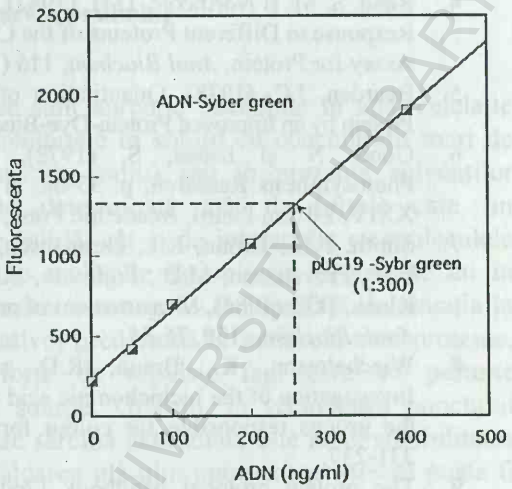


Figura 3.8. Curba de calibrare a fluorescenței complexului ADN - SYBR Green utilizată pentru estimarea concentrației pUC19

Probleme

1. Care dintre următoarele molecule poate fi detectată la 260 nm: a) Proteinele; b) Acizii nucleici; c) Histidina.
2. Folosind tehnica ADN-ului recombinat introduceți plasmidul (ADN-ul circular) pUC19 în susa DH5α. Enumerați metodele de transformare a bacteriilor găsite în literatura de specialitate (Sambrook, Molecular Cloning). Folosind un minikit (o trusă de reactivi) de izolare a plasmizilor extrageți ADN-ul (plasmidul) dintr-o cultură de celule de *Ecoli* DH5α.

Bibliografie:

1. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. și Randall, R.J. (1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *JBC*, **193**, 265-275.
2. Legler, G., Muller-Platz, C. M., Mentges-Hettkamp, M., Pflieger, G. și Julich, E. (1985), On the chemical basis of the Lowry protein determination, *Anal. Biochem.*, **150**, 278-287.
3. Bradford, M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

BCU BUCUREȘTI UNIVERSITY LIBRARY

4. Read, S. M. şi Northcote, D.H. (1982), Minization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein, *Anal Biochem*, **116 (1)**, 53–64.
5. Bearden, J.C. (1978), Quantitation of Submicrogram Quantities of Protein by an Improved Protein-Dye-Binding Assay, *BBA*, **533**, 525-529.
6. Good, N. şi Izawa, S. (1972), Hydrogen Ion Buffers for Photosynthesis Research, p. 53-68, in *Methods in Enzymology*, vol. XXIV, Ed San Pietro, Academic Press, New York.
7. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
8. Wiechelmann, K., Braun, R.D. şi Fitzpatrick, J.D. (1988), Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation, *Anal. Biochem.*, **175**, 231-237.
9. The protein protocol handbook (2nd edition) Walker, J.M. (ed), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2002.
10. Scope, R.K. (1974), Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm, *Anal. Biochem.*, **55**, 277-282.
11. Layne, E. (1957), Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. IV. Protein estimation by UV absorbtion, p. 451-457, in *Methods in enzymology*, 3, Eds Colowich, S.P. şi Kaplan, N. O., Academic Press, New York.
12. Sambrook, J. şi Russell, D.W. (2001), Molecular cloning. A laboratory manual (third edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 1, 1.61.
13. Vitzthum, F. şi Bernhagen, J. (2002) SYBR Green I: an ultrasensitive fluorescent dye for double-standed DNA quantification in solution and other applications. *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.*, **2**, 65-93.
14. Lakowicz J.R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy (2nd edition). Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY.

3.4. Tehnici de preparare a probelor

3.4.1. Precipitarea

Dacă proteinele fibroase sunt aproape insolubile în apă, celelalte proteine (solubile) pot fi precipitate în soluții cu concentrații mari de sare (sulfat de amoniu sau de sodiu) sau în prezența solvenților organici. Solubilitatea este determinată atât de forțele care țin moleculele grupate în stare solidă, cât și de interacțiile cu moleculele solventului, sărurile sau alte molecule de solvent. Proteinele au în general grupări încărcate pozitiv sau negativ la suprafață. În situația în care sarcinile pozitive (negative) predomină în molecula unei proteine, particulele vor exercita forțe de repulsie fapt care va permite menținerea moleculelor în soluție. Oricum, în vecinătatea punctului izoelectric (pI), pH-ul la care sarcina netă totală este zero, solubilitatea proteinelor este minimă. Valoarea pH-ului unui extract (țesut) poate fi ajustată la pI corespunzător proteinei de interes, fapt care va permite precipitarea moleculelor care posedă un pI asemănător. Precipitatul poate fi colectat prin centrifugare și redizolvat într-o cantitate minimă de amestec tampon. Există proteine (globulinele) care sunt insolubile în apă, dar pot fi solubilizate la creșterea ușoară a concentrației sărurilor (>0,1 M). Concentrațiile mici de sare determină în general o creștere a solubilității proteinelor, deoarece ionii sărurilor interacționează cu grupele încărcate de pe suprafața proteinelor și interferă cu forțele dintre proteine (din precipitat).

Unele săruri ($CaCl_2$ și NaSCN) interacționează cu proteinele și contribuie astfel la solubilizarea acestora. Folosirea unei concentrații mari de sare determină precipitarea majorității proteinelor în soluții apoase (ionii de sare interacționează mai puternic decât proteinele cu solventul, fapt care va determina interacții electrostatice de tipul proteină-proteină).

Proteinele sunt adesea stabilizate la concentrații mici ale alcoolilor sau cetonelor, la concentrații mari ale polihidroxialcoolilor (glicerina) sau zaharozei și în prezența unor polimeri sintetici (polietilen glicol, PEG). Ultimii sunt adesea utilizați drept agenți de precipitare datorită tendinței mărite de hidratare.

A. Precipitarea cu sulfat de amoniu

Sulfatul de amoniu este una dintre sărurile cele mai des utilizate datorită eficienței sale de precipitare, a domeniului de pH utilizat, solubilității mari și a prețului redus. Precipitarea cu ajutorul sulfatului de amoniu este una dintre etapele premergătoare cromatografiei de excludere sau dializei. Dat fiind faptul că majoritatea proteinelor precipită la o concentrație de sulfat de amoniu de 55%, o precipitare maximă se obține la o concentrație de sare de cca 80-85%. Există și proteine (S-100, proteina cu masa moleculară mică ce leagă ioni de calciu) care nu pot fi precipitate la concentrații mari de sulfat de amoniu. Tehnica poate fi folosită la stabilizarea proteinelor în soluție sau la îndepărtarea acizilor nucleici din extractul inițial.

Protocol

1. Într-un pahar Berzelius se introduc 20 ml soluție proteică (ser sanguin extras dintr-un țesut rezultat în urma sonicării în soluție tampon 50 mM) și se menține amestecul pe o baie cu gheață astfel încât temperatura soluției să nu depășească 10 °C (se utilizează un termometru digital pentru verificarea temperaturii);
2. Se cântăresc 4,16 g de sulfat de amoniu. Se adaugă treptat sarea (timp de 20-30 minute). Se continuă agitarea timp de 5-10 minute;
3. Se centrifughează amestecul timp de 10 min la 10000 rpm;
4. Se decantează supernatantul într-un pahar Berzelius. Se adaugă 7,16 g sulfat de amoniu timp de 30 min cu agitare moderată după care se lasă pe gheață timp de 20-30 minute;
5. Se centrifughează amestecul timp de 10 min la 10000 rpm. Precipitatul conține amestecul de proteine. Pentru îndepărtarea sulfatului de amoniu se poate utiliza dializa, ultrafiltrarea sau desalinizarea (utilizând o coloană de excludere a componenților în funcție de masa moleculară).

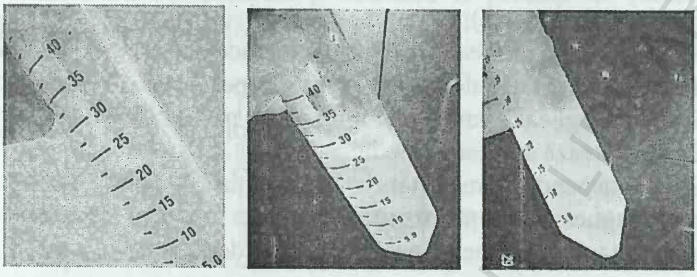


Figura 3.8. Precipitarea fracţiunilor care conţin albumină umană serică cu sulfat de amoniu
a) Soluţie proteică înainte de adăugarea sării;
b) Suspensie de precipitat proteic în soluţie 85% de sulfat de amoniu;
c) Precipitat proteic rezultat în urma centrifugării (60 min la 5000 rpm).

B. Precipitarea cu solvenţi organici

Solvenţii organici (acetona, etanolul) au efecte similare cu cele ale sărurilor (sulfatului de amoniu). Dat fiind faptul că proteinele pot fi denaturate la temperaturi mai mari de 10 °C (datorită flexibilităţii structurii polipeptidelor moleculele de solvent organic pătrund în interiorul proteinei şi se ataşează la catena laterală a aminoacizilor hidrofobi) precipitarea cu solvenţi organici trebuie efectuată la temperaturi mici (0-5 °C). Creşterea concentraţiei unui solvent organic miscibil cu apa la o soluţie apoasă care conţine proteina hidrofilă de interes schimbă puterea de solvatare a apei. Proteinele care prezintă mase moleculare mari (> 10 – 20 KDa) precipită în soluţii care conţin 50% solvent organic. Este cunoscut faptul că moleculele de proteină ce posedă o masă moleculară mare necesită o concentraţie mai mică de solvent organic. Deoarece acetona este utilizată în procente mai mici şi prezintă o volatilitate mai mare acest solvent este preferat la temperaturi mai mici.

Protocolul 1 – precipitarea proteinelor

1. Într-un pahar Berzelius se introduc 10 ml soluţie proteică (de concentraţie 5-50 mg/ml racită la 5 °C). Se adaugă treptat 10 ml

alcool etilic sau acetonă (răcită în prealabil la –20 °C) sub agitare continuă (pe gheață);
2. Se continuă agitarea 10-15 minute (această etapă este necesară deoarece cantitatea de precipitat este dependentă de temperatură);
3. Se centrifughează amestecul timp de 10 min la 10000 rpm;
4. Se decantează soluția limpede;
5. Se resuspendă precipitatul în soluția tampon dorită și se centrifughează soluția rezultată timp de 5 min la 2000 rpm pentru îndepărtarea proteinelor nesolubilizate (denaturate).

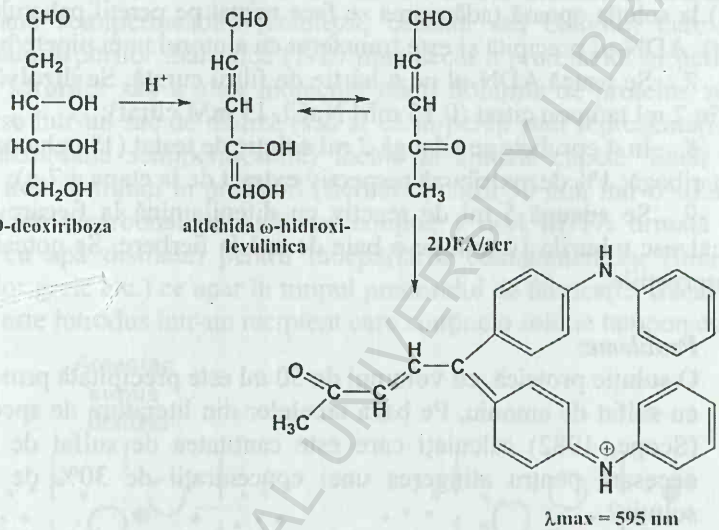
Protocolul 2 – Izolarea ADN-ului din drojdie

Trăsăturile ereditare sunt transmise prin intermediul genelor. Genele sunt porțiuni de ADN. În organismele inferioare, ca bacteriile și drojdiile, atât ADN-ul, cât și ARN-ul apar în citoplasmă. La organismele superioare, aproape tot ADN-ul este în interiorul nucleului, pe când ARN-ul este localizat în organitele celulare și în citoplasmă.

Pentru izolarea ADN-ului din celulele de drojdie acestea sunt în prima fază distruse. Detergenții (bromura de hexadecil trimetil amoniu) ajută la solubilizarea membranelor și dezactivarea nucleazelor (enzime care scindează acizii nucleici; nucleazele pot fi dezactivate și de EDTA care complexează ionii metalici). Prin utilizarea unei soluții hipotonice saline se aplică un șoc celulelor de drojdie. Odată prezenți în soluție acizii nucleici trebuie separați de ceilalți constituenți ai celulei. Proteinele sunt asociate cu acizii nucleici. Adăugarea percloratului de sodiu ($NaClO_4$) permite disocierea acestor complecși. Separarea componenților poate fi realizată prin extracție/precipitare (lipide/proteine) cu cloroform-alcool izoamilic. Stratul apos conține în principal acizii nucleici. Adăugarea unei soluții de etanol permite precipitarea moleculelor mai mari (ADN, ARN). ADN-ul fiind o moleculă mare, fibroasă poate fi îndepărtată din soluție cu ajutorul unei baghete de sticlă/spatule. ARN-ul precipită la baza recipientului și nu poate fi separat în aceeași manieră. După izolarea ADN-ului se va face testul cu difenilamina, reacție care permite identificarea deoxiribozei.

Mai exact, ADN-ul este inițial depurinat și deshidratat de la deoxizahar la aldehida ω-hidroxi-levulinică. Această aldehidă condensează

în mediu acid cu difenilamina şi conduce la produşi de condensare coloraţi în albastru închis (λ = 595 nm).



Schema 3.9. Reacţia de identificare a dezoxiribozei

Modul de lucru

1. Se răceşte un mojar pe gheaţă. În paralel, se cântăresc 2-3 g drojdie şi 4-6 g nisip (spălat în prealabil cu o soluţie acidă) sau bile de sticlă. Se mojarează amestecul timp de 5-10 min pentru a distruge celulele de drojdie;

2. Se preîncălzesc 25 ml de soluţie tampon pentru izolare (2% bromură de hexadecil trimetil amoniu, 0,15 M NaCl, 0,2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris la pH 8,0) la 60 °C;

3. Se adaugă suspensia mojarată în soluţia tampon şi se incubează 20 min la 60 °C (cu inversarea tubului la fiecare 2-3 min);

4. Se decantează suspensia rezultată într-un pahar Erlenmeyer de 250 ml. Se răceşte soluţia şi se adaugă 5 ml de $NaClO_4$ 6M şi se omogenizează conţinutul. Se transferă 40 ml cloroform-izopentanol în pahar şi se agită conţinutul 10 min (la fiecare 15 secunde se deschide capacul). Se lasă 10 min în repaus;

BCU "I. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Se transferă stratul apos (superior) cu o pipetă într-un alt pahar Erlenmeyer;

6. Se adaugă un volum dublu de alcool izopropilic (răcit în prealabil) la soluția apoasă (adăugarea se face treptat pe pereții paharului înclinat). ADN-ul precipită și este transferat cu ajutorul unei pipete/baghete;

7. Se usucă ADN-ul pe o hârtie de filtru curată. Se dizolvă ADN-ul în 2 ml tampon citrat (0,15 mM NaCl, 15 mM citrat);

8. În 4 eprubete se adaugă 2 ml soluție de testat (1% glucoză; 1% riboză; 1% dezoxiriboză respectiv extract de la etapa a 7-a);

9. Se adaugă 5 ml de reactiv cu difenilamină la fiecare tub. Se încălzesc tuburile 10 min pe o baie de apă la fierbere. Se notează toate observațiile.

Probleme:

1. O soluție proteică, cu volumul de 50 ml este precipitată prin metoda cu sulfat de amoniu. Pe baza tabelelor din literatura de specialitate (Scope, 1982) calculați care este cantitatea de sulfat de amoniu necesară pentru atingerea unei concentrații de 30% de sare în soluție?
2. ADN-ul din banană este precipitat prin tehnica precipitării. Estimați concentrația de ADN folosind metoda spectrală. Ce factor de diluție trebuie folosit pentru a obține o valoare a absorbanței, la 260 nm, mai mică decât unitatea? Ce tip de cuvă utilizați în aceste măsurători?

Bibliografie:

1. Bollag, D.M. și Edelstein, S.J. (1991), Protein Methods (2nd edition), John Willey and Sons, p. 72-84.
2. Scope, R.K. (1982), Protein Purification. Principles and Practice, Speinger-Verlag, New-York, p. 71-102.
3. Ingham, K.C. (1984), Protein precipitation with PEG, *Meth. Enzymol.*, **104**, 351-355.
4. Kaufman, S. (1971) Fractionation of protein mixtures with organic solvents, *Meth. Enzymol.*, **22**, 233-238.
5. Iordăchescu, D. și Dumitru I.F. (1988), Biochimie Practică (Ediția a 2-a), București, p. 52-57.
6. Rehm, H., Protein Biochemistry and Proteomics (2006), Elsevier, p. 13-14.

3.4.2. Dializa si ultrafiltrarea

Îndepărtarea sărurilor (sau solvenților organici) din proteinele precipitate se poate realiza prin *dializă*. În cadrul dializei se folosesc membrane semipermeabile (celuloză, celofan sau colodiu) care au dimensiunea porilor mai mică (1-10 nm) decât a proteinelor și permit difuzia sărurilor sau a altor molecule mici. Soluțiile de proteine sunt introduse într-un sac de dializă (sac ai cărui pereți sunt reprezentați de către membrana semipermeabilă) închis la ambele capete. Sacii de dializă trebuie tratați în prealabil (fierbere pentru 30 min într-o soluție 10 mM de bicarbonat de sodiu ce conține 1 mM EDTA urmată de clătire cu apă distilată) pentru îndepărtarea contaminanților (ionilor metalelor grele etc.) ce apar în timpul procesului de fabricație. Sacul de dializă este introdus într-un recipient care conține o soluție tampon cu o

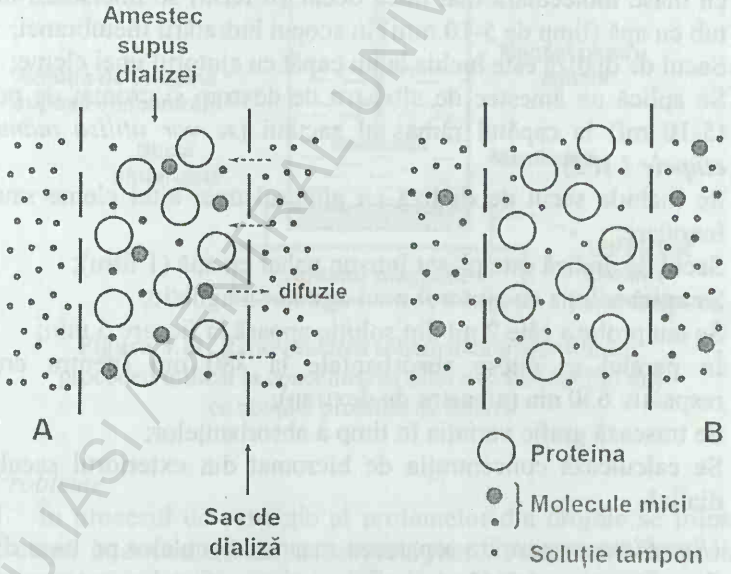


Figura 3.10. Dializa unei soluții proteice în scopul îndepărtării sărurilor sau solvenților organici. A. *Amestec inițial supus dializei.* Moleculele mai mici difuzează prin membrană spre exteriorul sacului de dializă, iar moleculele soluției tampon în sens invers. B. *După dializă repetată* proteina se află în soluția tampon adecvată

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

concentrație mică. Porii membranelor au dimensiuni mai mici decât ale proteinelor din soluție, permițând trecerea prin difuzie a moleculelor cu mase moleculare mici (săruri, peptide, ioni metalici, cofactori legați necovalent cu mase moleculare mai mari decât 3,5 KDa). Echilibru se stabilește în cel puțin 4 ore. De obicei, dializa se repetă de încă 3-4 ori timp de 4 ore pentru schimbarea totală a mediului în care se află proteina. Dializa probelor cu volum mic (1-2 ml) poate fi făcută în dispozitive speciale (tuburi GeBAflex) a căror membrane au dimensiunea porilor variabilă (permițând trecerea moleculelor de la 3,5 la 14 KDa).

Protocol

1. Sacul de dializă (cu dimensiune a porilor adecvată pentru molecule cu mase moleculară mai mică decât 10 KDa) se imersează într-un tub cu apă (timp de 5-10 min) în scopul hidratării membranei;
2. Sacul de dializă este închis la un capăt cu ajutorul unei cleme;
3. Se aplică un amestec de albastru de dextran şi cromat de potasiu (5-10 ml) la capătul rămas al sacului (*se vor utiliza mănuşi în etapele 1 şi 2*);
4. Se închide sacul de dializă cu ajutorul unei altei cleme sau prin înnodare;
5. Sacul de dializă este plasat într-un pahar cu apă (1 litru);
6. Se agită soluția cu ajutorul unui agitator magnetic;
7. Se iau probe a câte 2 ml din soluția apoasă la fiecare 5 min;
8. În paralel se citesc absorbanțele la 380 nm (pentru cromat) respectiv 630 nm (albastru de dextran);
9. Se trasează grafic variația în timp a absorbanțelor;
10. Se calculează concentrația de bicromat din exteriorul sacului de dializă.

Ultrafiltrarea permite separarea macromoleculelor pe baza dimensiunilor, formei sau încărcării. Sub acțiunea forțelor externe soluția supusă separării trece printr-o membrană. Aceste membrane (acetat de celuloză, nylon, poliviniliden) sunt atașate pe un suport inert şi permit înlocuirea soluției tampon sau clarificarea soluției proteinei (de exemplu membrana de 0,45 μm folosită la sterilizarea soluțiilor folosite

în biologia moleculară sau a probelor care sunt sensibile la temperatură).

Tehnica este de obicei mai rapidă (2-3 ore) decât dializa. Pentru separarea volumelor mari se folosesc incinte de 100, 250 ml sau un litru prevăzute cu membrane rezistente la presiune (concentratoare). Sub acțiunea presiunii gazului (azot, argon) moleculele mai mici trec prin membrană, iar cele mari rămân în incintă.

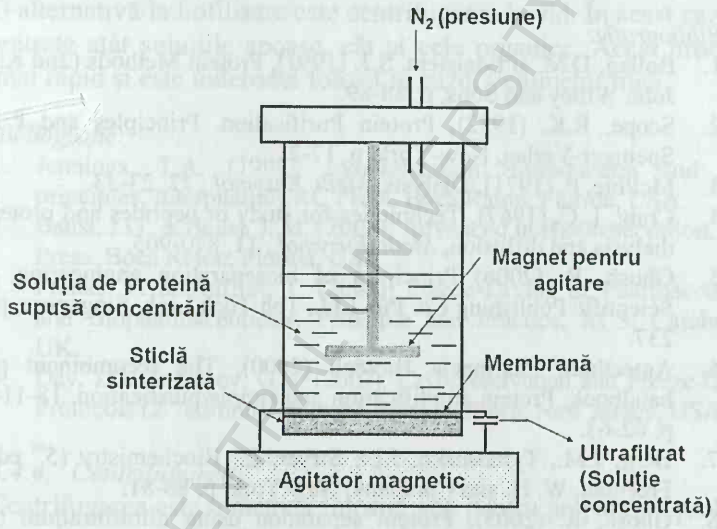


Figura 3.11. Reprezentarea schematică a ultrafiltrării, procedeu utilizat la concentrarea unui extract (50-500 ml) ce conține proteina de interes

Probleme

1. În procesul de extracție al proteinelor din drojdie se foloseşte drept etapă intermediară etapa de precipitare. Amestecul de proteine precipitat conține proteina de interes (alcool dehidrogenaza) care are o masă moleculară de 140 KDa şi patru subunități cu aceeaşi masă moleculară fiecare. Indicați dimensiunea porilor sacilor de dializă necesari pentru a îndepărta proteinele cu masa moleculară mai mică de 5 KDa şi a nu permite pierderea proteinei de interes.

2. În procesul de ultrafiltrare al unei soluții proteice (alcool dehidrogenaza) se utilizează o membrană care permite difuzia moleculelor cu dimensiuni de circa 1 KDa. Care dintre următoarele componente părăsește soluția inițială:

a) Tamponul;
b) Proteina;
c) Apa.

Bibliografie:

1. Bollag, D.M. şi Edelstein, S.J. (1991), Protein Methods (2nd edition), John Willey and Sons, p. 88-89.
2. Scope, R.K. (1982), Protein Purification. Principles and Practice, Speinger-Verlag, New-York, p. 17-21.
3. McPhie, P. (1971), Dialysis, *Meth. Enzymol.*, **22**, 23-33.
4. Craig, L.C. (1967), Techniques for study of peptides and proteins by dialysis and diffusion, *Meth. Enzymol.*, **11**, 870-905.
5. Ghosh, R. (2006) Principles of bioseparation engineering, Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Toh Tuck Link, Singapore, p. 235-237.
6. Amersham Pharmacia Biotech (2000), The recombinant protein handbook: Protein amplification and simple purification, 18-1142-75, p. 62-63.
7. Berg, J.M., Tymosczko, J.L., Stryer, L., Biochemistry (5th edition), Freeman, W. H. and Company, New York, p. 80-81.
8. Ghosh, R. (2003), Protein separation using ultrafiltration: theory, applications and new developments, Imperial College Press, London.
9. Amicon Publication (1986), Centricon microconcentrators for small-volume concentration, I-259C.

3.4.3. Liofilizarea

Probele biologice au în general o stabilitate redusă în soluție. Liofilizarea este o tehnică de uscare bazată pe procesul de sublimare a apei (solventului) din stare solidă (de obicei soluția este înghețată în azot lichid, iar temperatura incintei este de -50 ÷ -40 °C) în stare de vapori sub acțiunea presiunii reduse (5-20 mm Hg). Astfel, materialele mai puțin volatile (proteinele, acizi nucleici, sărurile aflate în soluția tampon) sunt concentrate sub forma unei pulberi sau a unei pelicule.

Acest fapt conferă stabilitate mărită probelor (compuşi chimici folosiţi în industria farmaceutică, vaccinuri, alimente etc.). Această tehnică reduce în mod considerabil volumul probei. În unele situaţii (de exemplu în cazul unor reacţii organice ale căror pH este controlat prin folosirea unor săruri anorganice) liofilizarea precede etapa de desalinizare a probelor, a căror puritate poate fi verificată ulterior prin separare (HPLC).

O alternativă la liofilizare este centrifugarea la vid. În acest caz sunt concentrate atât soluţiile apoase, cât şi cele organice. Acest procedeu este mai rapid şi este îndeosebi folosit în cazul volumelor mici.

Bibliografie:

1. Jennings, T.A. (1999), Lyophilization: Introduction and basic principles, Interpharm/CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
2. Baust, J.G. & Baust, J. M. (2007), Advanced in Biopreservation, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. Franks, F. & Auffret, T. (2007), Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: Principle and Practice, RCS, Cambridge, UK.
4. Day, J.G. & Stacey, G.N. (2007), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (2nd edition), Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

3.4.4. Centrifugarea

Centrifugarea este o metodă folosită atât pentru prepararea probelor cât şi analiza acestora. Metoda are la bază separarea moleculelor sub acţiunea unor forţe (rezultate la rotirea probei cu viteze mari). Deplasarea moleculelor depinde de mărimea, forma şi densitatea macromoleculelor sau a soluţiei în care se află acestea.

Principiul metodei

Particulele din soluţie/suspensie sunt supuse forţei centrifuge, F, definită prin ecuaţia următoare: $\mathbf{F = m\omega^2 r}$

unde: m – masa efectivă a particulei;
ω – viteza unghiulară de rotaţie (rad/s);
r – distanţa particulei de la axa centrală de rotaţie.

Masa efectivă a particulei este definită astfel:

$$m = m_0 - m_0\bar{v}\rho$$

unde: m_0 – masa actuală a particulei;

$\bar{v}$ – volumul specific parțial – modificarea de volum ce intervine când particula este aflată într-un volum mare de solvent;

ρ – densitatea solventului (mediului).

Combinând primele două ecuații se obține dependența următoare:

$$F = m_0(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r$$

Forța centrifugă este contracarată de o altă forță numită forță de frecare F_f definită astfel: $F_f = fv$

unde: f – coeficient de frecare (depinde de mărimea și forma particulei sau de vâscozitatea solventului);

v – viteza de sedimentare a particulei.

Forța de frecare crește cu viteza de sedimentare a particulei până la o valoare constantă, moment în care cele două forțe (F și F_f) se echilibrează.

$$m_0(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r = fv = f\left(\frac{dr}{dt}\right)$$

Din această relație se poate deduce viteza de sedimentare:

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{m_0(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r}{f}$$

Coeficientul de sedimentare, s, o caracteristică fizică utilizată pentru clasificarea macromoleculelor și organitelor celulare, este dat de expresia:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m_0(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unitatea de măsură pentru coeficienții de sedimentare este Svedbergul ($1\ S = 1 \cdot 10^{-13}$ s). Dacă hemoglobina umană are coeficientul de sedimentare 4,5 S, complecşii biologici (ribozomul, viruşii) sunt caracterizați de valori mari ale acestui coeficient.

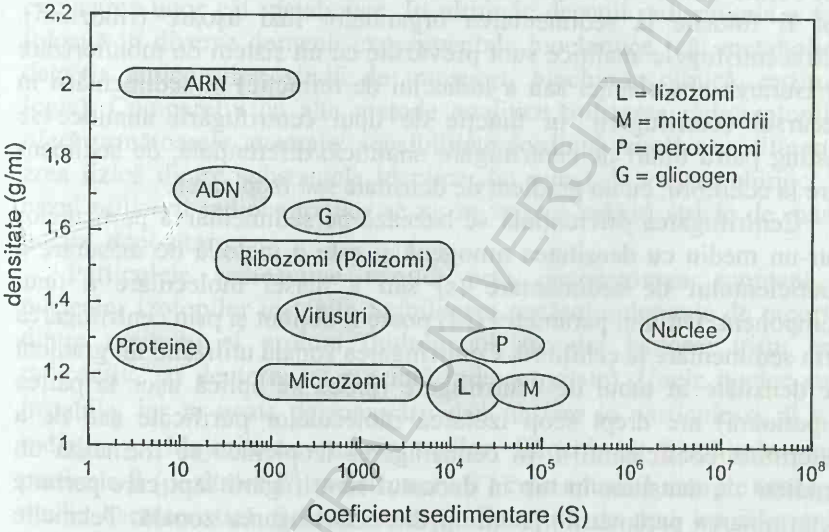


Figura 3.12. Reprezentarea schematică a coeficienților de sedimentare a biomoleculelor (proteinelor, acizilor nucleici, polizaharurilor) sau organitelor celulare în funcție de densitate

Cele mai frecvente dispozitive destinate centrifugării operează până la 6000 rpm prevăzute cu un sistem de ajustare a temperaturii (între 4 °C şi temperatura camerei). Aceste centrifuge sunt destinate sedimentării particulelor mai mari (nucleului sau peretelui celular de alte organite) sau celulelor roşii. În urma acestui proces se formează două faze distincte: faza solidă se află la partea inferioară a tubului şi faza lichidă (supernatantul) ce poate fi îndepărtată prin centrifugare sau cu ajutorul unei pompe de vid (de exemplu în cazul precipitării cu acid tricloracetic proteinele se colectează sub formă de solid în urma centrifugării).

Dacă centrifugarea la viteze mici şi medii este folosită în special în scopuri preparative, ultracentrifugele (centrifuge care operează la temperaturi mici şi la presiune joasă) pot fi folosite şi în scopuri analitice. În cazul unei centrifuge prevăzute cu un rotor cu unghi fix se pot obţine viteze de rotaţie de până la 100.000 rpm. Aceste dispozitive pot fi folosite la sedimentarea organitelor mai uşoare (ribozomi). Ultracentrifugele analitice sunt prevăzute cu un sistem de monitorizare (măsurarea absorbanţei sau a indicelui de refracţie) al sedimentării în decursul centrifugării. În funcţie de tipul centrifugării analitice se disting patru tipuri de centrifugare analitică: diferenţială, de sedimentare la echilibru, cu un gradient de densitate sau izopicnică.

Centrifugarea diferenţială se bazează pe sedimentarea particulelor într-un mediu cu densitatea omogenă şi este o metodă de măsurare a coeficientului de sedimentare (s) sau a masei moleculare a unui component. Ultimul parametru (M) poate fi obţinut şi prin centrifugarea prin sedimentare la echilibru. Centrifugarea zonală utilizând un gradient de densitate în tubul de centrifugare (proba se aplică uşor la partea superioară) are drept scop izolarea moleculelor purificate sau de a determina coeficientul s. În centrifugarea izopicnică se formează un gradient de densitate în tub în decursul centrifugării fapt care permite determinarea parametrilor obţinuţi din centrifugarea zonală. Tehnicile care folosesc un gradient de densitate sunt folosite pentru izolarea şi purificarea componentelor subcelulare (microzomi, mitocondrii etc.). În această manieră se pot separa mai uşor unele biomolecule aflate în aceste compartimente.

Probleme

1. Localizaţi în laborator dispozitivele pentru centrifugare. Câte tipuri de rotoare sunt disponibile pentru centrifuga Heraus? Ce volume de soluţie pot fi centrifugate cu acest dispozitiv? Ce viteze de centrifugare maxime pot fi atinse?
2. O proteină aflată într-un amestec de 100 de proteine şi peptide precipită la o concentraţie ţintă de 55% sulfat de amoniu. Un student vrea să folosească etapa de precipitare drept o etapă intermediară (etapa de concentrare) în procesul de purificare al

acestei proteine. În ce interval de concentrație de sulfat de amoniu trebuie precipitată proteina?

3.4.5. Marcarea probelor biologice cu radioizotopi

Inițial radioizotopii erau utilizați în biochimie doar pentru explicarea unor căi metabolice. În ultimele decenii radiochimia a fost folosită în diverse domenii experimentale biochimice (căi metabolice, detecția anticorpilor, studii de transport, biochimie clinică, enzimologie). Comparativ cu alte metode analitice utilizarea radioizotopilor oferă următoarele avantaje: sensibilitate (ordinul pmol) sau diferențierea fizică dintre substanțele identice din punct de vedere chimic. În cazul utilizării radioizotopilor se au în vedere măsuri stricte de manipulare, depozitare.

Particulele radioactive rezultă prin dezintegrarea spontană a nucleelor izotopilor instabili. Stabilitatea nucleului depinde de raportul dintre neutroni şi protoni (hidrogenul are doi izotopi: tritiu este radioactiv, iar deuteriu nu prezintă radioactivitate). Unele nuclee sunt instabile, iar în urma dezintegrării dau naştere la particule α, β sau radiații γ. Majoritatea radioizotopilor folosiți în biochimie emit particule β (pozitroni β^+ sau electroni β^-) cu o anumită energie (energie medie caracteristică fiecărui izotop). Ecuațiile de mai jos ilustrează dezintegrarea a doi radioizotopi, proces însoțit de emisia de particule β,

$$^{65}_{30}Zn \longrightarrow {}^{65}_{29}Cu + \beta^+ + \nu_e$$

unde:

ν_e - neutrino

$\bar{\nu}_e$ - antineutrino

$$^{32}_{15}P \longrightarrow {}^{32}_{16}S + \beta^- + \bar{\nu}_e$$

Emisia de radiații β este însoțită adeseori de emisie de radiații γ. Izotopul iodului, ^{131}I, este un exemplu de emisie secvențială:

$$^{131}_{53}I \longrightarrow {}^{131}_{54}Xe + \beta^-$$

$$\longrightarrow {}^{131}_{54}Xe + \gamma$$

Fiecare radioizotop emite radiație γ de o energie caracteristică, permițând astfel identificarea acestuia.

Dezintegrarea spontană a nucleului este un proces care se supune unei cinetici de ordinul unu. Rata de dezintegrare a N atomi este proporțională cu numărul de atomi radioactivi.

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

unde: λ – constantă de dezintegrare.

Prin integrarea ecuației de mai sus (între 0 și t) rezultă ecuația:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}$$

unde:
N – numărul de atomi radioactivi la momentul t;
N_0 – numărul de atomi radioactivi la momentul t = 0.

Prin logaritmarea ecuației exponențiale se obține ecuația:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -\lambda t$$

Timpul de înjumătățire, $t_{1/2}$, timpul necesar dezintegrării unei jumătăți din numărul de atomi radioactivi inițiali, este invers proporțional cu constanta de dezintegrare a izotopului folosit.

$$\ln \frac{N_0/2}{N_0} = -\lambda t_{1/2} \qquad t_{1/2} = \frac{0{,}693}{\lambda}$$

Izotopi utilizați în Biochimie

O caracteristică importantă a izotopilor folosiți în laboratorul de biochimie este timpul de înjumătățire. În majoritatea cazurilor sunt folosiți izotopi care au timpul de înjumătățire de ordinul zilelor. De exemplu, ^{32}P unul dintre cei mai frecvenți folosiți izotopi în

experimentele biochimice are timpul de înjumătățire de cca 14 zile, fapt care permite utilizarea acestuia în măsurătorile cantitative (ATP marcat). ^{131}I a fost utilizat în aplicațiile medicale (măsurarea procentului asimilat de tiroidă, în scopul vizualizării unor țesuturi sau pentru marcarea unor anticorpi). Autoradiografia este una din tehnicile utilizate în detecția și localizarea moleculei radioactive în țesuturi, celule, organitelor celulare sau a moleculelor acizilor nucleici marcate.

Radioizotopii cu viață scurtă (^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, izotopi care emit pozitroni) sunt folosiți pentru aplicații biomedicale (tomografii etc.). ^{35}S este un izotop frecvent utilizat pentru marcarea proteinelor (în particular a anticorpilor, proteine care au în componență grupări -SH). Compușii care conțin atomi marcați cu ^{3}H sau ^{14}C sunt adesea folosiți în domeniul biomedical, îmbunătățirea produselor farmaceutice și agroalimentare, investigarea reacțiilor chimice din organismele vii (în cataliza acido-bazică) sau pentru modificarea compușilor biochimici (modificarea substraturilor sau liganzilor prin schimb izotopic sau sinteză, etichetarea aminoacizilor sau nucleotidelor care sunt intermediari ai metabolismului).

Unitățile de măsură cele mai des folosite pentru exprimarea radioactivității sunt *Curie* (Ci, cantitatea de material radioactiv care emite particule cu o rată de dezintegrare de $3,7 \times 10^{10}$/s) sau *Bequerel* (Bq; 1 Ci =$3,7 \times 10^{10}$ Bq).

Tabel 3.13. Proprietățile radioizotopilor folosiți în biochimie

Particula emisă	Izotop	Energia Particulei (MeV)	$t_{1/2}$
α	^{226}Ra	4,78	1600 ani
β^-	^{3}H	0,018	12,3 ani
	^{14}C	0,155	5570 ani
	^{24}Na	1,39	15 h
	^{32}P	1,71	14,2 zile
	^{35}S	0,167	87,1 zile
	^{36}Cl	0,714	822 ani
	^{40}K	1,33	$1,3 \cdot 10^{9}$ ani
	^{45}Ca	0,25	165 zile

Particula emisă	Izotop	Energia Particulei (MeV)	$t_{1/2}$
	^{59}Fe	0,46	45 zile
	^{60}Co	0,318	5,3 ani
	^{90}Sr	0,54	29 ani
	^{131}I	0,61; 0,33	8,1 zile
	^{137}Cs	0,51	30 ani
β^+	^{22}Na	0,55	2,6 ani
	^{65}Zn	0,33	245 zile
γ	^{22}Na	1,28	2,6 ani
	^{24}Na	1,7; 2,75	15 ore
	^{59}Fe	1,1	45 zile
	^{60}Co	1,3	5,3 ani
	^{65}Zn	1,14	245 zile
	^{90}Sr	0,035	29 ani
	^{125}I	0,035; 0,027	60 zile
	^{131}I	0,64; 0,36; 0,28	8,1 zile
	^{137}Cs	0,66	30 ani
	^{226}Ra	0,19	1600 ani

Rata de dezintegrare a probei depinde de puritatea acesteia şi de constanta de dezintegrare. Din aceste motive se preferă folosirea termenului de *activitate specifică*, care se defineşte drept rata de dezintegrare/unitatea de masă a atomilor radioactivi (mCi/mmol sau μCi/μmol).

În experimentele cu radioizotopi se iau măsuri de siguranţă deosebite (camere speciale, recipienţi speciali de colectare a materialului radioactiv, ecrane de protecţie dacă este cazul, utilizarea unui dispozitiv de înregistrare a nivelului de radiaţii mediu emis într-o anumită perioadă de timp).

Întrebări

1. Calculaţi timpul de înjumătăţire al unui izotop care la momentul t = 0 avea activitatea de 100 dezintegrări/min, iar după o oră 60 dezintegrări/min.
2. Calculaţi constanta de dezintegrare, λ, a izotopului ^{35}S.

3. Care izotop este unul dintre cei mai folosiți în experimentele biochimice? De ce?
4. De cât timp are nevoie un izotop de ^{32}P cu activitatea 1300 dezintegrări/min să atingă activitatea de 30 dezintegrări/min?
5. O soluție de ATP radioactiv (marcat cu ^{32}P) și-a redus activitatea la 25%. Poate fi folosită această soluție în marcarea biomoleculelor cu ^{32}P?

Bibliografie:

1. Slater, R., Editor (2002), Radioisotopes in Biology (2nd edition), Oxford University Press, Oxford, UK.
2. Leiser, K. (2002), Nuclear and Radiochemistry: Fundamentals and Applications (2nd edition), John Willey and Sons, New York.
3. Wilson, K. şi Walker, J., Editors (2000), Principles and Techniques of Practical Biochemistry (5th edition) Cambridge University Press, Cambridge, p. 687-728.
4. Welch, M.J. şi Redvanly, C.S. (Ed) (2003), Hanbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and application, John Willey and Sons (New York), p. 425-435.
5. Darnell, J., Lodish, H. şi Baltimore, D. (1990), Molecular cell biology (2nd edition), p. 191-197.
6. Ren, S., McNamara, P., Koharski, D., Hesk, D., Borges, S. (2009), Design and synthesis of sulfur-35 labeling agents and their applications for protein labeling, *J. Label Compd. Radiopharm,* **52**, 316-323.
7. Voges, R., Heys, J.R. şi Moenius, T. (2009) Preparation of Compounds labeled with tritium and carbon-14, John Willey and Sons, NY.

BCU IASI / CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 4

Separarea şi detecţia proteinelor şi acizilor nucleici. Amplificarea ADN-ului

4.1. Electroforeza cu ajutorul gelurilor de SDS-poliacrilamidă

Consideraţii teoretice

Electroforeza constituie o metodă rapidă de cuantificare, comparare şi caracterizare a purităţii proteinelor, ADN-ului sau ARN-ului.

Principiul electroforezei: moleculele încărcate (proteine, acizi nucleici) se deplasează de-a lungul unui gel într-un câmp electric. Gelul este asemeni unei site moleculare care permite moleculelor mai mici să se deplaseze mai rapid, iar celor mai mari să înainteze mai lent.

Amestecurile de proteine sunt separate prin intermediul SDS-poliacrilamid electroforezei (*engl.* SDS = sodium dodecyl sulfate – dodecil sulfatul de sodiu). Tehnica a fost introdusă de Shapiro şi colaboratorii în 1967. Acizii nucleici sunt separaţi de obicei în geluri de agaroză.

Pentru a străbate mai uşor aceste site moleculare moleculele de proteină sunt denaturate (despachetate) cu ajutorul detergenţilor (SDS) şi a agenţilor reducători (β-mercapto-etanolul sau DTT-ul, ditio-treitolul, care desfac punţile disulfidice; de exemplu papaina şi proteina disulfid – izomeraza se împachetează prin intermediul legăturilor S-S). În stare denaturată proteinele au aproximativ aceeaşi formă. Astfel, mărimea proteinelor este aproximativ proporţională cu masa lor moleculară. Această corelaţie face posibilă estimarea masei moleculare

a proteinelor necunoscute cu ajutorul unor proteine martor a căror masă moleculară este deja cunoscută.

SDS-ul interacționează cu părțile hidrofobe ale proteinei (lanțurile de proteină despachetate leagă SDS-ul formând structuri elipsoidale) rezultând micelii încărcate negativ care au o masă moleculară constantă (1,4 g SDS / g proteină). Miceliile încărcate negativ se deplasează spre anod cu o distanță de migrare proporțională cu logaritmul masei moleculare a proteinei.

Gelurile care au un gradient al dimensiunii porilor permit o separare mai bună (benzi mai ascuțite) comparativ cu gelurile în care dimensiunea porilor nu variază.

Există un număr de avantaje practice ale SDS-electroforezei:

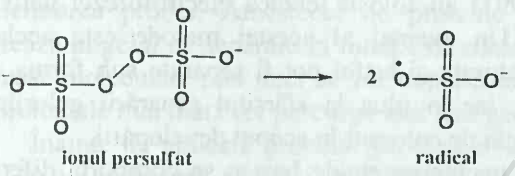
a) SDS-ul (detergentul) solubilizează aproape toate proteinele;
b) Miceliile de SDS-proteină, fiind puternic încărcate negativ, posedă o mobilitate electroforetică;
c) Lanțurile polipeptidice sunt despachetate și alungite în urma tratamentului cu SDS și separarea se poate face în geluri cu o anumită dimensiune a porilor;
d) Separarea se bazează pe un singur parametru fizico-chimic, masa moleculară;
e) Izoenzimele nu apar sub forma unor benzi diferite;
f) Proteinele separate prin SDS-electroforeză se leagă mai bine de colorant.

SDS-electroforeza se poate face într-un sistem continuu (folosind un tampon fosfat, Weber și Osborn, 1968) sau discontinuu (valori diferite ale pH-ului sau tăriei ionice, Lammli, 1970).

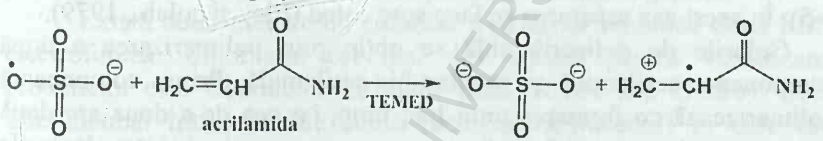
Sistemul discontinuu (care folosește în mod uzual Tris-Glicina) nu poate fi aplicat și la peptidele cu mase moleculare mai mici decât 14 KDa. Această problemă a fost rezolvată de Schagger și Jagow (1987) prin folosirea unor geluri și substanțe tampon diferite în cazul migrării.

Glicoproteinele migrează mai încet în SDS-electroforeză datorită grupărilor de zahăr care nu sunt încărcate (nu leagă SDS). Acest inconvenient poate fi evitat prin utilizarea unei soluții tampon borat-EDTA (Poduslo, 1981), tampon ce permite încărcarea restului de carbohidrat.

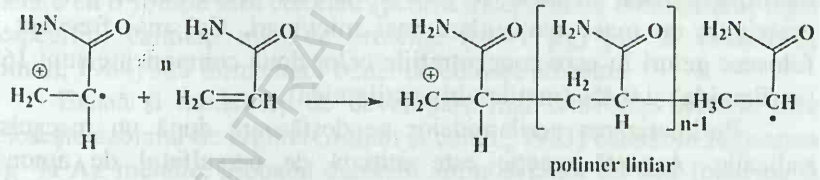
1. Etapa de inițiere:

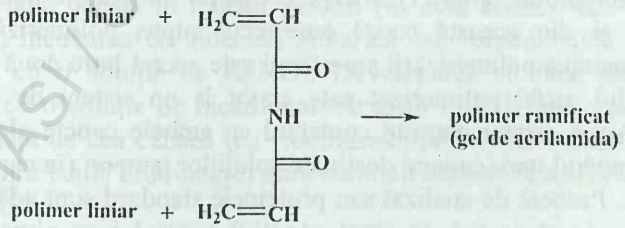


2. Etapa de propagare:



3. Etapa de elongare:





Schema 4.1. Mecanismul reacției de polimerizare/reticulare a acrilamidei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteinele membranare nu sunt solubilizate de detergenții ionici (SDS). Pentru a evita interferența dintre detergenții ionici și neionici Schagger și Jagow (1991) au folosit tehnica electroforezei native în prezența colorantului. Un avantaj al acestei metode este acela că proteinele nu sunt denaturate și astfel pot fi separate sub forma unor complecși de proteine, iar în plus la sfârșitul separării gelurile nu trebuie incubate cu soluția de colorant în scopul developării.

Proteinele acide și nucleoproteinele bazice se comportă diferit în SDS-electroforeza. O soluție este aceea care utilizează detergenții cationici (bromura de cetil-tri-metil-amoniu, *engl.* CTAB) în mediu acid (pH 3-5). În acest caz separarea se face spre catod (Eley și colab., 1979).

Gelurile de poliacrilamidă se obțin prin polimerizarea a două componente acrilamidă și metilen-bis-acrilamidă. Prima componentă polimerizează cu formarea unui lanț lung, iar cea de-a doua are două capete reactive permițând formarea unor conexiuni între lanțurile liniare. Raportul dintre metilen-bis-acrilamidă și acrilamidă dictează mărimea porilor. În cazul în care porii sunt mici/mari se pot separa proteinele cu mase moleculare mai mici/mari. Cel mai frecvent se folosesc geluri în care concentrațiile celor două componente sunt 16% (acrilamida) și 0,4% (metilen-bis-acrilamida).

Polimerizarea acrilamidelor se desfășoară după un mecanism radicalic. Această reacție este inițiată de persulfatul de amoniu, $(NH_4)_2S_2O_8$ (*engl.* APS). Drept catalizator se folosește N,N,N',N'-tetrametilendiamina (*engl.* TEMED). Oxigenul din soluție inhibă polimerizarea și din această cauză amestecul supus polimerizării este degazat. Înaintea polimerizării amestecul este așezat între două plăci de sticlă. Gelul astfel polimerizat este atașat la un sistem de separare vertical. Acest sistem permite contactul cu ambele capete ale gelului prin intermediul unor camere destinate soluțiilor tampon (în care se află electrozii). Probele de analizat sau proteinele standard sunt adăugate la partea superioară (catod, încărcat negativ) a gelului cu ajutorul unei pipete Hamilton. Datorită faptului că amestecul de proteine este situat la câțiva mm deasupra gelului (într-un locaș separat) și diferențelor dintre cantitățile (volumele) de probă aplicate punctul de start poate varia. Acest inconvenient poate fi depășit prin folosirea unui gel de

aşezare care este polimerizat deasupra gelului de separare. Gelul de aşezare (cu lăţimea de cca 1 cm) are porii mai mari şi permite concentrarea probei. Amestecul de proteine din proba concentrată migrează în gelul de separare în funcţie de masa moleculară. Proteinele cu mase moleculare mai mici se vor deplasa mai repede spre anod(+), iar proteinele mai mari vor parcurge mai lent gelul polimerizat.

Înainte de aplicare probele (proteinele) denaturate sunt amestecate cu un colorant, albastru de bromfenol, încărcat negativ. Acest colorant permite vizualizarea separării indicând momentul în care proteinele mai mici sunt aproape de partea inferioară a gelului.

Există două metode de colorare a gelurilor rezultate după SDS-electroforeză. Colorantul cel mai des utilizat pentru vizualizarea proteinelor este Coomassie Brilliant Blue (R-250 sau G-250). Gelul este incubat într-o soluţie acidă (acid acetic/metanol) în care este dizolvat colorantul. Proteinele sunt astfel fixate şi devin încărcate pozitiv, fapt care determină o interacţiune puternică cu colorantul. După spălare cu o soluţie fără colorant (pentru îndepărtarea colorantului legat nespecific) cantităţi mici de proteine (0,1-1 μg) pot fi vizualizate (Smith, 1984) sub forma unor benzi de culoare albastră.

Există şi modalităţi de developare mai sensibile. Metoda care foloseşte azotatul de argint (Giulian şi colab., 1983) constă în reducerea Ag^+ la Ag metalic, probabil datorată aminoacizilor cu sulf (cisteina şi metionina) şi a aminoacizilor bazici (arginină, lizină sau histidină). Prima etapă constă în fixarea gelului (în acid acetic), cea de-a doua etapă în incubarea cu aldehidă glutarică sau formaldehidă şi în final tratarea cu o soluţie de $AgNO_3$. Developarea se face prin tratarea gelului cu o soluţie de bicarbonat. Această metodă are o sensibilitate mărită faţă de cea clasică (cu Coomassie) permiţând vizualizarea (sub forma unor benzi brun-negre) unor cantităţi extrem de mici (1-10 ng) de proteină.

În funcţie de procentul de acrilamidă din gel se poate stabili intervalul de separare dorit (Tabelul 4.2).

Tabel 4.2. Intervalele de rezoluție optimă folosite la separarea proteinelor (Hames, 1981)

Acrilamidă (%)	Intervalul de separare (KDa)
15	15-45
12,5	15-60
10	18-75
7,5	30-120
5	60-210

Parte experimentală

Soluții stoc utilizate: Tris-HCl 2M (pH 8.8), Tris-HCl 1M (pH 8.8), 10% SDS, 50% glicerină, 1% albastru de bromfenol

Soluții de lucru:

A – Acrilamidă (mono 30%, bis 0,8%)

B – soluție de separare (4x): Tris-HCl 1,5M (pH 8.8) + 0,4% SDS

C – soluție de așezare (4x): Tris-HCl 0,5M (pH 6.8) + 0,4% SDS

10% APS (persulfat de amoniu) – stabil la 4 °C

Tampon pentru electroforeză: 25 mM Tris, 192 mM Glicină, 0,1% SDS pH 8.3.

Soluție pentru probe (5x): 60 mM Tris-HCl 1M (pH 6.8), 25% glicerină, 2% SDS, 14,4 mM 2-mercapto-etanol, 0,1% albastru de bromfenol (Smith et al., 1988); se păstrează la –20 °C.

Atenție: acrilamida este neurotoxică! Folosiți mănuși la prepararea soluțiilor.

Pentru prepararea unui *gel de separare* (volumul final 10 ml) cu concentrația de acrilamidă c% sunt necesari c/3 ml soluție A, 2,5 ml soluție B, (7,5-c/3) ml apă distilată, 50 µl APS 10% și 5 µl TEMED.

Înainte de prepararea gelului de separare se asamblează plăcile de sticlă. Între aceste plăci se interpun 2 distanțatori. Se fixează sistemul pe dispozitivul de separare (ex. BioRad Mini-Gel) și se verifică etanșeitatea acestuia. În cazul în care sistemul este etanș se prepară amestecul de polimerizare și în final se adaugă APS-ul și TEMED-ul.

Se pipetează rapid amestecul între plăcile de sticlă până la o distanţă de 1,5 cm de partea superioară a sandwich-ului. Se adaugă câteva picături de n-butanol sau izopropanol cu scopul de a obţine o suprafaţă dreaptă după polimerizare (30-60 min). Gelurile pentru separare pot fi ţinute timp de o săptămână la 4 ºC (partea de sus a gelului este acoperită cu o soluţie diluată, 1:4, de B).

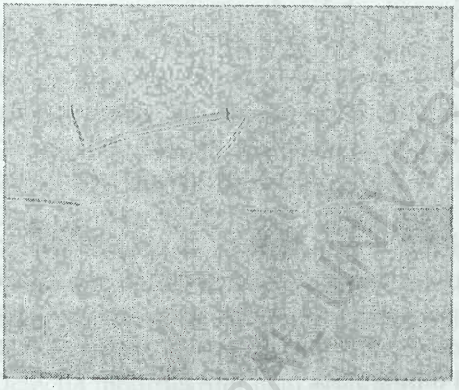


Figura 4.3. SDS-Electroforeza unor proteine pure sau amestecuri de proteine în geluri de poliacrilamidă (AA-acrilamidă)
Gel de aşezare 4% AA; Gel de separare 10% AA.

Linia 1 – soluţie standard ce conţine o paletă largă de proteine cu diverse mase moleculare (10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 respectiv 225 KDa; Promega); Linia 2 – hemoglobină umană (17 KDa); Linia 3 – acil-CoA dehidrogenaza (45 KDa); Linia 4 – γ-globulină bovină (fracţiunea II); Linia 5 – soluţie standard Serva (29, 45, 67, 97 KDa); Linia 6 – ser sanguin uman. Benzile au fost vizualizate utilizând metoda cu Coomasie

Prepararea *gelului de aşezare* (volumul final 4 ml, concentraţia de acrilamidă) sunt necesari 2,3 ml apă, 0,67 ml soluţie A, 1,0 ml soluţie C, 30 µl APS 10% şi 5 µl TEMED. În prima fază se îndepărtează alcoolul şi se spală partea de sus a gelului de separare cu apă distilată (2-3 ori) după care se îndepărtează resturile rămase de apă cu o hârtie

de filtru. Se plasează pieptenele în partea de sus a sandwich-ului după care se toarnă gelul de aşezare (concentrare) astfel încât să nu apară bule de aer la partea inferioară a acestuia. Se lasă gelul la polimerizat timp de 20-30 min. După polimerizarea gelului de aşezare se îndepărtează pieptenele cu grijă şi se spală locaşurile cu apă distilată (2-3 ori). Sandwich-ul care conţine gelurile (de separare şi aşezare) este aşezat în camera de electroforeză. Se adaugă soluţia tampon pentru electroforeză în ambele rezervoare ale dispozitivului.

Se amestecă proba cu o soluţie stoc 5x (vezi sus), se încălzeşte amestecul la 95 °C timp de 5-7 min, se centrifughează scurt proba dacă aceasta conţine un precipitat, iar supernatantul se aplică (cu ajutorul unei seringi Hamilton fără a introduce bule de aer) într-un locaş al gelului de aşezare. Într-un alt locaş se aplică amestecul standard de proteine.

Probele migrează în gel la 200 V şi 60 mA (80 mA) pentru gelurile cu grosimea 0.75 mm (1.5 mm). Durata separării este de cca 45 min. La sfârşitul separării se opreşte sursa de alimentare, se deconectează cablurile, se scoate sandwich-ul din dispozitiv, se îndepărtează distanţatoarele şi se ia gelul dintre plăci.

Vizualizarea proteinelor

1. Metoda cu Coomasie

Se imersează gelul (*se utilizează mănuşi!*) după separare în 30 ml de soluţie de colorare (0,1% Coomasie R-250, 45% metanol, 10% acid acetic) şi se agită timp de 10-20 min. După incubare se reciclează soluţia de colorant şi se clăteşte gelul cu apă distilată. Se adaugă apoi 50 ml din soluţia de decolorare (10% metanol, 10% acid acetic). Se incubează gelul timp de 1 h după care se observă clar benzile proteinelor. Soluţia de decolorare poate fi reutilizată după amestecarea acesteia cu cărbune activ şi filtrare.

2. Metoda cu azotat de argint

Gelul se fixează într-o soluţie acidă (50% metanol, 10% acid acetic) timp de 1 h (sau peste noapte). Se clăteşte gelul cu apă timp de 10 minute. Se repetă clătirea de 2 ori. Se aşează gelul într-un recipient curat şi se colorează timp de 15 min cu soluţia de colorare (5 ml soluţie de $AgNO_3$ 20% proaspăt preparată se adaugă în picătură la un amestec

bazic – 21 ml NaOH 0.36% + 1.4 ml NH_4OH 30% – astfel încât precipitatul maron trebuie să dispară; se completează cu apă până la 100 ml). Se incubează gelul într-o soluţie proaspătă de acid citric şi formaldehidă (0,5 ml acid citric, 50 µl aldehidă formică în 100 ml soluţie). Benzile apar în aproximativ 2-5 min. În cazul în care apare un fundal galben reacţia trebuie stopată cu o soluţie de acid acetic 1%. Gelul este din nou clătit cu apă (de 3 ori timp de 20 min).

Atenţie: $AgNO_3$ – iritant al pielii! Formaldehida – vapori iritanţi!

Aplicaţiile SDS-electroforezei:

1) Analiza purităţii proteinelor;
2) Determinarea masei moleculare a proteinei;
3) Verificarea concentraţiei proteinei;
4) Detecţia proteolizei;
5) Identificarea proteinelor imunoprecipitate;
6) Prima etapă a imunoblotingului – proteinele pot fi transferate pe o membrană de nitroceluloză (vezi tehnica Western Blot) în timp ce SDS-ul poate fi îndepărtat;
7) Detecţia modificărilor unei proteine;
8) Separarea şi concentrarea proteinelor antigen cu scopul producerii anticorpilor;
9) Separarea proteinelor marcate cu radioizotopi.

Probleme

1. Ce este electroforeza?
2. Care este rolul SDS-ului în electroforeză?
3. Care este diferenţa între SDS-electroforeză şi electroforeza în condiţii native?
4. În ce etapă a preparării acrilamida nu este toxică?
5. Din ce motive sunt încălzite la 95 ^{0}C probele care conţin amestecul de proteine ce urmează a fi supus electroforezei?
6. Care este colorantul cel mai des utilizat la developarea gelurilor după electroforeză?
7. Ce sunt proteinele standard şi în ce scop sunt acestea utilizate?
8. Ce indică intensitatea benzilor rezultate după developare?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. Unde se situează proteinele cu masa moleculară mai mare după efectuarea electroforezei şi developării?

Bibliografie:

1. Laemmli, UK. et al. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
2. Rehm, H. (2006) Protein biochemistry and proteomics, Elsevier, London, UK.
3. Scope, R.K. (1994) Protein Purification: Principles and Practice, 3rd ed, Springer Verlag, NY.
4. Walker, J.M. (1994) Basic protein and peptide protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 32, chapter 5, Humana Press, Totowa, NJ.
5. Holtzhauer, M. (2006) Basic Methods for the Biochemical Lab, 1st ed, Spinger, Heidelberg, Germany, p. 26-65.
6. Keren, D.F. (2003) Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis, Holder Arnold, London.
7. Ausubel, F.M. şi colaboratorii (1999) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley, USA.
8. Bollag, D.M. şi Edelstein, S.J. (1991) Protein Methods. Wiley-Liss, NY.
9. Darnell, J., Lodish, H. şi Baltimore, D. (1990) Molecular Cell Biology, Scientific American Books, NY.

4.2. Tehnica Western Blot

Consideraţii teoretice

Această tehnică (imunoblot sau Western Blot) este utilizată pentru detectarea unei proteine care a fost imobilizată în prealabil pe o membrană. Proteinele din gelurile de poliacrilamidă interacţionează greu cu anticorpii din soluţie, de aceea este indicat să se facă transferul pe o suprafaţă (membrană) care să permită mai bine interacţiunea proteină-anticorp. Membranele pentru blotting sunt din nitroceluloză, fluorură de poliviniliden (PVDF) sau Nylon încărcat pozitiv. Membranele leagă proteinele prin interacţii hidrofobe (nitroceluloză) sau interacţii hidrofobe şi ionice (Nylon încărcat pozitiv).

În multe experimente biochimice este necesară determinarea unei proteine dintr-un amestec de proteine (de exemplu extractul rezultat în urma lizei celulare). O asemenea identificare este uşurată în situaţia în

care cercetătorul are la dispoziţie anticorpul (monoclonal sau policlonal) proteinei de interes.

În această tehnică se disting două etape. În prima etapă proteinele sunt separate prin SDS-gel electroforeză, gel electroforeză în condiţii native sau prin intermediul focusării izoelectrice. În cea de-a doua etapă proteina imobilizată (antigenul sau mai precis porţiunea de interacţiune a acestuia cu anticorpul-epitopul) poate interacţiona cu anticorpul, molecula care la rândul său poate fi decorată cu un sistem de detecţie biochimic (enzimatic) sau radiochimic. Există şi posibilitatea de legare a peptidelor care au mai mult de 20 aminoacizi în compoziţie.

Membrane utilizate în tehnica Western Blot

Nitroceluloza este membrana cea mai des utilizată în tehnica Western Blot. Mărimea porilor membranei este cuprinsă între 0,05 μm şi 0,45 μm. Cu cât porii sunt mai mici cu atât capacitatea de legare este mai mare. Proteinele absorbite pe nitroceluloză pot fi colorate reversibil astfel încât proteinele totale pot fi estimate înaintea detecţiei. Există însă şi situaţii când Nylonul poate fi utilizat pentru transferul proteinelor dacă se impune o capacitate mare de legare sau în situaţia în care proteina (cu masă moleculară mare sau cu un conţinut mare de acizi) se leagă slab de membrană. Difluorura de poliviniliden (PVDF) asemeni Nylonului se distinge printr-o capacitate de legare şi o stabilitate ridicată. Aceste membrane pot fi utilizate în secvenţierea directă a proteinelor.

Parte experimentală

A. Echipamente necesare

– Aparat de electroblotting semiuscat;
– Sursa de tensiune;
– Hârtie Whatmann;
– Membrana (Nitroceluloză sau Nylon);
– Agitator orizontal.

B. Reactivi

– Soluţia tampon de transfer;
– Soluţia de blocare (5% lapte praf sau 2% BSA în soluţia tamponului de transfer);

– Anticorp primar;
– Anticorp secundar;
– 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat (BCIP);
– clorura de p-nitro albastru de tetrazoliu (NBT);
– dimetil formamida (DMF).

C. Protocol

Gelul rezultat după separarea prin SDS-electroforeză se aşază pe o membrană. Între cei doi electrozi şi perechea gel-membrană se utilizează 2-3 straturi de hârtie de filtru Wattman, cu dimensiune similară cu cea a gelului/membranei, care au fost în prealabil imersate în tamponul de transfer. Transferul proteinelor se face în prezenţa unui câmp electric. Proteinele încărcate negativ (datorită SDS-ului) se deplasează din gel spre membrană (de nitroceluloză sau fluorura de poliviniliden, PVDF), în direcţia anodului (polul pozitiv).

Transferul în Western Blotting se face prin două variante:

1. prin utilizarea unor *camere de transfer verticale* prevăzute cu electrozi din platină fixate de o parte şi de alta a sandwich-ului de transfer. Pentru această metodă gelul şi membrana sunt poziţionate între 2 bucăţi de hârtie şi 2 bureţi subţiri şi suspendate în soluţia tampon din camera de transfer. De obicei transferul se face peste noapte (cel puţin 3-4 ore sunt necesare pentru transfer). O soluţie tampon de glicină-Tris (pH 8,3) este utilizată pentru transfer. Această valoare a pH-ului nu trebuie să cauzeze denaturarea proteinelor. Mai mult, proteinele sunt parţial încărcate şi de aceea transferul este de lungă durată. Uneori este avantajos să se utilizeze o soluţie tampon de CAPS (pH 9,9 cu NaOH) care determină un transfer mai rapid. În mod curent soluţia tampon conţine 20% metanol cu scopul creşterii capacităţii de transfer şi a evitării expandării membranei. Gelurile acide (folosite pentru proteine bazice) sau cele rezultate după focusarea izoelectrică sunt transferate într-un tampon care conţine acid acetic 0,7%. Pentru glicoproteine, polizaharide şi lipozaharide este recomandată o soluţie de borat de sodiu (pH 9,2), deoarece acidul boric se leagă de resturile de zahăr şi ca urmare în mediu bazic moleculele devin încărcate negativ.

2. *Transferul semi-uscat*

În cazul *sistemelor continue* transferul se efectuează între două plăci orizontale de grafit. Numai o cantitate limitată de soluţie tampon (Tris-glicina–SDS conţinând 20% metanol) este utilizată (câteva bucăţi de hârtie sunt umectate în soluţia de tampon).

Sistemele discontinue sunt preferabile (folosesc 3 tipuri de soluţie tampon), deoarece transferul este mai eficient şi dă naştere la benzi mai subţiri (rezoluţie mai mare). Această tehnică este simplă, mai ieftină şi mai rapidă (transferul se face în 1-2 h). Pentru detecţia enzimelor soluţia tampon nu trebuie să conţină metanol, deoarece acesta ar putea afecta activitatea enzimatică. Pentru transferul gelurilor denaturante (ce conţin o cantitate ridicată de uree), care succed focusarea izoelectrică, acestea trebuie incubate într-o soluţie tampon (acid 6-amino hexanoic cu 20% metanol şi 0,01% SDS), cu scopul reîncărcării proteinelor.

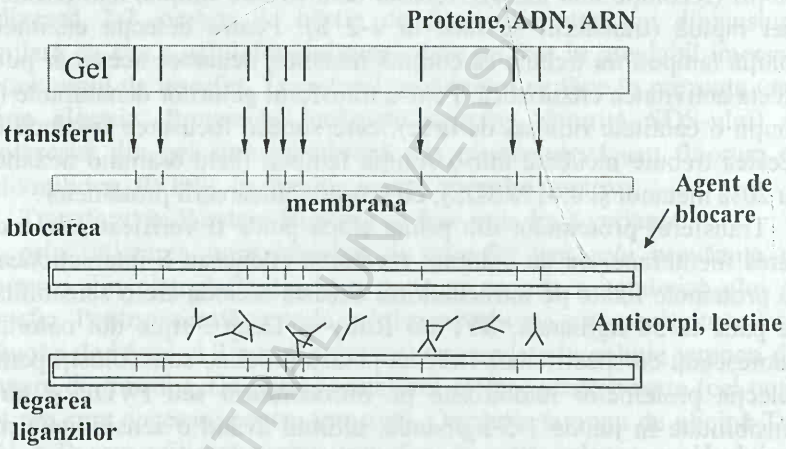
Transferul proteinelor din prima etapă poate fi verificat prin incubarea membranei cu un colorant reversibil (Ponceau S interacţionează cu proteinele fixate pe nitroceluloză, această metodă are o sensibilitate de până la 50 ng/bandă; SYPRO Ruby şi Deep Purple doi coloranţi fluorescenţi cu specificitate ridicată pentru proteine sunt folosiţi pentru detecţia proteinelor imobilizate pe nitroceluloză sau PVDF şi au o sensibilitate în jur de 1-5 ng/bandă, ultimul având o sensibilitate mai ridicată). Transferul lărgeşte posibilitatea de detecţie în cazul fracţiunilor separate prin electroforeză deoarece moleculele absorbite pe suprafaţa membranei pot interacţiona cu diferiţi liganzi (antigeni, anticorpi, lectine sau acizi nucleici).

Etapa de blocare constă în acoperirea situsurilor libere de pe membrană cu ajutorul unor macromolecule, substanţe care nu participă la reacţia de recunoaştere a antigenului de interes. În acest scop sunt folosite diverse soluţii (2-10% albumina serică, 5% lapte praf degresat, sau 0,05% Tween 20).

Membrana de nitroceluloză este blocată cu o soluţie tampon TBST (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2% Tween 20 care conţine 1% lapte praf degresat; pH = 7,5) timp de 1 h la temperatura camerei (cu o uşoară agitare).

Imunodetecția

După blocarea membranei proteinele aflate pe suprafața membranei de nitroceluloză sunt disponibile pentru legarea primului anticorp. Se incubează membrana timp de 2 h cu agitare ușoară la temperatura camerei cu o soluție diluată a primului anticorp (în tampon TBST). Se spală membrana de 3 ori timp de 10 min cu același tampon (care nu conține anticorpul).



Schema 4.4. Etapele Blottingului pornind de la gelurile rezultate după electroforeză

Determinarea propriu-zisă se face cu ajutorul celui de-al doilea anticorp, care are afinitate pentru primul anticorp. Primul anticorp provine din imunizarea iepurilor (șoarecilor). Cel de-al doilea anticorp provine din capră și este compatibil cu primul produs de iepure.

Se incubează timp de 1 h, la temperatura camerei, membrana cu anticorpul al doilea (al cărui antigen este anticorpul 1) preparat în TBST. Se spală de 3 ori membrana timp de 10 min cu TBST (fără lapte) la temperatura camerei.

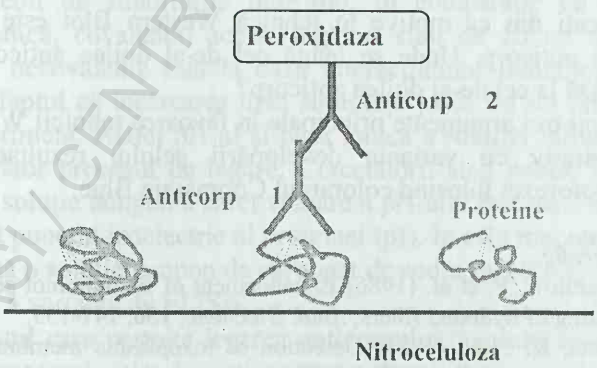
Cel de-al doilea anticorp este cuplat cu o enzimă care catalizează o reacție de identificare. În mod curent această enzimă este o peroxidază sau fosfatază alcalină. După adăugarea ambelor substrate (apa

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

oxigenată şi diamino-benzidina în cazul peroxidazei, respectiv BCPI şi NBT în cazul fosfatazei alcaline) enzima oxidează substratul la un produs insolubil colorat, în aşa fel încât precipită pe suprafaţa complexului proteină-anticorp permiţând identificarea proteinei.

Pentru detecţie se incubează membrana la temperatura camerei timp de 5 min, cu uşoară agitare, în 25 ml de tampon de developare (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9,5). Se adaugă substratele: 100 µl BCIP (25 mg/ml dizolvată în 100% DMF); 100 µl NBT (25 mg/ml dizolvată în DMF / H2O = 70 / 30). Se incubează membrana timp de 10-15 min în funcţie de cantitatea de antigen imobilizată pe membrană. Se spală membrana cu apă pentru a opri reacţia de developare. Se usucă membrana şi se păstrează între două hârtii de filtru la întuneric.

În cazul în care pentru peroxidază se folosesc drept substrate luminolul şi acidul cumaric produsul rezultat se remarcă printr-o luminiscenţă deosebită având o sensibilitate cu trei ordine de magnitudine mai ridicată decât metodele standard de detecţie.



Schema 4.5. Principiul tehnicii Western Blot:
Proteinele fixate pe membrana de nitroceluloză sunt detectate cu anticorpul 1, acesta se leagă specific de anticorpul 2 (cuplat cu enzima peroxidază). Complexul este identificat în urma unei reacţii enzimatice

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O alternativă a reacţiilor enzimatice o constituie marcarea cu izotopi radioactivi (tehnica RIA) a celui de-al doilea anticorp (^{125}I-anti-iepure-anticorp IgG; IgG-imunoglubulina G), procedeu cu o sensibilitate mult mai mare comparativ cu metodele de detecţie bazate pe reacţiile enzimatice.

Metoda Western blot este larg răspândită în analizele biochimice şi clinice. Această metodă permite identificarea unor proteine dintr-un amestec de proteine, respectiv permite stabilirea interacţiunii dintre două sau mai multe proteine (punerea în evidenţă a complecşilor proteici).

Probleme

1. Cum sunt transferate proteinele de pe un gel (supus în prealabil electroforezei) pe o membrană?
2. Care este modalitatea prin care se observă dacă s-a desfăşurat transferul proteinelor?
3. Din ce motive este important ca gelul să fie în contact cu membrana, iar bulele de gaz să fie pe cât posibil inexistente?
4. Care este rolul primului anticorp în tehnica Western Blot?
5. Explicaţi din ce motive în tehnica Western Blot este utilizat al doilea anticorp. Unde se leagă cel de-al doilea anticorp? Ce se ataşează la cel de-al doilea anticorp?
6. Aduceţi trei argumente principale în favoarea tehnicii Western Blot comparativ cu varianta developării gelului rezultat în urma electroforezei folosind colorantul Coomassie Blue.

Bibliografie:

1. Swerdlow, P. et al. (1986) Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters, *Anal. Biochem.*, **156**, 147-153.
2. Ogata, K. et al. (1983) Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-PAGE to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 75-82.
3. Blake, M. et al. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots, *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Boyer, R. (2000) Identification of serum glycoproteins by SDS-PAGE and Western blotting, *Modern Experimental Biochemistry*, 3th edition, p. 321-331.
5. Farrell, S. şi Farrell, L. (1995) A Fast and Inexpensive Western Blot Experiment for the Undergraduate Laboratory, *J. Chem. Educ.*, 73, 740-742.
6. Westermeier, R. (1997), *Electrophoresis in Practice*, 2nd edition, Wiley, Weinheim, Germany.
7. Bollag, D.M. şi Edelstein, S.J., *Protein Methods*, Willey-Liss, p. 181-210.
8. http://teachline.ls.huji.ac.il/72320/methods-tutorial/western/western-blot.html#procedure

4.3. Testul ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay)

ELISA permite detectarea şi cuantificarea rapidă a prezenţei unui antigen într-o probă. Proteinele din proba de analizat sunt absorbite pe o suprafaţă inertă (un suport pentru 96 de probe). Alegerea suprafeţei poate influenţa în mod hotărâtor sensibilitatea determinării. Suprafaţa inertă poate fi o matrice din plastic pe care sunt grefate grupe hidrofile sau hidrofobe. Proteinele polare dizolvate în soluţii tampon se leagă în mod deosebit de suporturile hidrofile. În comparaţie cu legăturile clasice (ionică, covalentă) aceste legături sunt de 10 ori mai slabe. Legăturile necovalente stau la baza interacţiunilor imunologice. Este bine ştiut faptul că încărcarea unei suprafeţe joacă un rol important în acest experiment. Astfel pH-ul şi tăria ionică a soluţiei influenţează în mod hotărâtor procesul de legare. Cercetătorii aleg pentru acoperirea matricei o soluţie tampon a cărei valoare a pH-ului este cu 2 unităţi mai mare decât punctul izoelectric al proteinei (pI). În cele mai multe cazuri este folosită o soluţie tampon de carbonat de sodiu (pH 9.6).

Există 3 variante de ELISA:

- testul care permite legarea anticorpului (captura anticorpului). În acest test molecula de antigen este absorbită, iar mai târziu un anticorp marcat se leagă de aceasta;
- testul cu doi anticorpi (anticorpi sandwich). Pentru acest test primul anticorp este imobilizat pe matrice. Antigenul se leagă de acest anticorp. Un la doilea anticorp (marcat) se poate lega de antigen (la alt epitop) interacţiune care poate fi monitorizată spectral;

• testul care permite legarea antigenului (captura antigenului). În acest test anticorpul este fixat pe suprafață, după care antigenul se poate lega. Proteina (antigenul) care s-a legat nespecific este îndepărtată după mai multe spălări. Antigenii (marcați) care sunt fixați pe anticorp permit detectarea.

A) *Testul care permite legarea anticorpului (determinarea antigenului imobilizat)*

Legarea unui antigen (diluat în soluție tampon bicarbonat-carbonat la pH bazic sau fosfat salin-PBS) pe un suport este un proces care necesită un anumit interval de timp pentru a se atinge limita de saturație. Această saturare se atinge după cca 18 h. Timpul poate varia în funcție de temperatura la care are loc legarea. După incubare, excesul de antigen este îndepărtat prin spălare (prin cicluri umplere-golire cu soluție PBS).

Suprafața este spălată cu soluția unei proteine (caseina din lapte praf, gelatina sau albumina serică bovină) pentru a împiedica legarea nespecifică a proteinelor ulterioare pe suprafață. Suprafața este apoi tratată cu o soluție care conține primul anticorp (anticorpul proteinei de interes care nu este etichetat sau marcat). Anticorpul nelegat specific este îndepărtat prin spălare și suprafața este tratată cu o soluție conținând anticorpi pentru primul anticorp. Acești anticorpi secundari au de regulă grefată o enzimă. Astfel, dacă anticorpii detectați sunt produși în iepure, anticorpii etichetați cu enzima sunt imunoglobuline anti-iepure. Anti-speciile conjugate pot fi anti-IgM, anti-IgG_1 sau anti-IgG_2. Produsul format (monitorizat prin intensitatea culorii produsului de reacție din reacția enzimatică) este proporțional cu concentrația proteinei de interes din proba de analizat. Cea mai cunoscută variantă de ELISA folosește o matrice (placă din plastic) prevăzută cu 96 de lăcașuri, fiecare dintre acestea cu o capacitate maximă de cca 300 µl. După incubări reacția poate fi monitorizată cu un spectrofotometru special adaptat pentru acest tip de matrice.

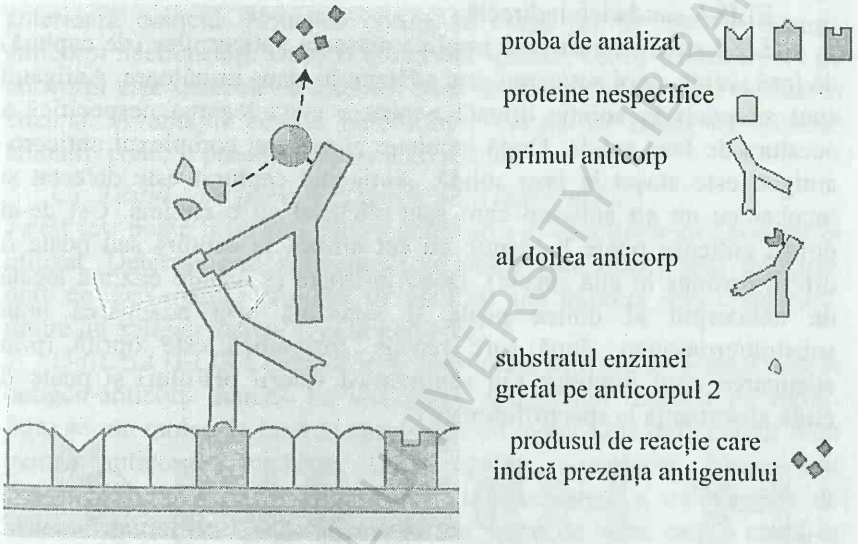


Figura 4.6. Testul ELISA folosit la detectarea unui anticorp dintr-o probă

B) *Testul cu doi anticorpi (anticorpi sandwich)*

Acest test este recomandat pentru detectarea şi cuantificarea unei molecule de antigen (care are cel puţin doi epitopi) dintr-o probă necunoscută. Datorită folosirii anticorpilor monoclonali acest test este extrem de specific. Această modalitate de testare este recomandată când antigenul analizat se află în soluţie cu o serie de alte proteine. După legarea antigenului la anticorpul monoclonal, celelalte proteine din soluţie pot fi îndepărtate prin spălare.

Sensibilitatea testului depinde de mai mulţi factori:

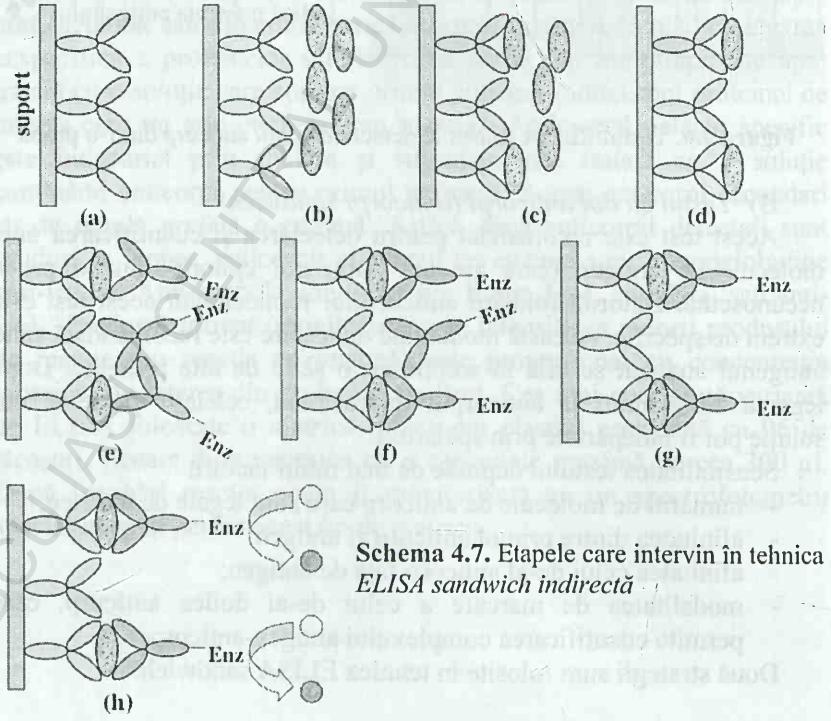
- numărul de molecule de anticorp care sunt legate de matrice;
- afinitatea dintre primul anticorp şi antigen;
- afinitatea celui de-al anticorp faţă de antigen;
- modalitatea de marcare a celui de-al doilea anticorp, care permite cuantificarea complexului antigen-anticorp.

Două strategii sunt folosite în tehnica ELISA sandwich:

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ELISA sandwich directă;
- ELISA sandwich indirectă.

ELISA sandwich directă implică ataşarea anticorpilor (de captură) de fază solidă, apoi antigenul este adăugat în etapa următoare. Antigenii sunt adăugaţi în soluţie diluată pentru a evita legarea nespecifică a acestora de faza solidă. După incubare şi spălare, complexul anticorp-antigen este ataşat la faza solidă. Antigenul capturat este detectat şi incubat cu un alt anticorp care este etichetat cu o enzimă. Cel de-al doilea anticorp poate fi identic cu cel utilizat în captură sau poate fi diferit (produs în altă specie). După incubare şi spălare enzima legată de anticorpul al doilea poate fi detectată prin adăugarea unui substrat/cromogen, după care reacţia enzimatică este oprită (prin adăugarea unui inhibitor sau schimbarea valorii pH-ului) şi poate fi citită absorbanţa la spectrofotometru.



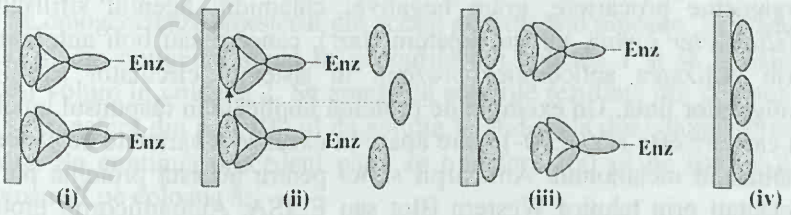
Schema 4.7. Etapele care intervin în tehnica *ELISA sandwich indirectă*

În metoda *ELISA sandwich indirectă* etapele a-d din metoda anterioară coincid. Noutatea constă în etapa (e) în care se adaugă anticorpi neetichetaţi. După o ulterioară spălare, cel de-al doilea set de anticorpi este detectat cu ajutorul unui anticorp pe care este grefată o enzimă. Avantajul acestei determinări constă în faptul că ultimul anticorp poate fi produs în mai multe specii.

C) *Testul care permite cuantificarea antigenului*

Acest test poate fi utilizat pentru detectarea şi cuantificarea antigenului utilizat. Determinarea antigenului se poate face direct prin folosirea unui antigen marcat în proba de analizat sau indirect prin competiţia dintre un antigen marcat şi unul nemarcat.

C-ELISA (ELISA competitivă) presupune deja prezenţa unui sistem antigen-anticorp marcat. La adăugarea antigenului (nefixat pe suprafaţă) aceste molecule intră în competiţie cu moleculele antigenului fixat pentru anticorpul etichetat. După spălare complecşii liberi sunt îndepărtaţi din sistem şi se observă o descreştere a culorii faţă de sistemul iniţial. În lipsa antigenului din proba de testat sau în cazul în care similarităţile antigenului liber cu cel imobilizat sunt minime, aceste molecule nu sunt în competiţie cu anticorpul marcat şi ca urmare nu există nici o competiţie. Gradul de competiţie depinde de concentraţia relativă a moleculelor de antigen liber sau imobilizat.



Schema 4.8. Etapele care intervin în tehnica *ELISA competitivă*

În testele ELISA se apelează la anticorpi sau antigeni marcaţi. De obicei se folosesc anticorpi marcaţi (se pot procura de la companii specializate în producerea acestora). De obicei cuplarea se face cu o enzimă (fosfataza alcalină, peroxidaza din hrean, ureaza) a cărui

substrat este incolor. Produsul de reacție este colorat și poate fi monitorizat prin metode spectrale. Există teste similare (LIA – light immunoloassay) de evidențiere a anticorpilor. Acești anticorpi pot fi etichetați cu compuși fluorescenți (FITC-fluorescein izotiocianat, roșu de TEXAS) sau pot fi conjugați cu alte molecule (biotina esterificată reacționează cu grupările amino ale anticorpilor; biotina are afinitate mare pentru streptavidina – o proteină din albușul de ou – și astfel poate fi detectată cu ajutorul acestei proteine marcate).

Antigenii sau anticorpii pot fi marcați și cu substanțe radioactive (enzime marcate cu ^{125}I). În determinările radioimunologice (*engl./* RIA – radioimmunoassay) radioactivitatea complexului poate fi măsurată. În locul RIA este preferată metoda ELISA cu anticorpi pe care sunt grefați enzime deoarece această metodă are sensibilitate asemănătoare dar se evită expunerea la radiațiile emanate de izotopi.

Testul ELISA este frecvent utilizat pentru detectarea substanțelor cu proprietăți antigenice (proteine-anticorpi, hormoni și antigeni de origine bacteriană). De exemplu, gonadotropina corionică umană (HCG) este o proteină (hormon secretat în principal de placentă) care poate indica prezența sarcinii. În cazul unei infecții se poate determina un anumit antigen care este specific agentului patogen (o proteină din capsida virală, o enzimă secretată de bacterii). Prin intermediul tehnicii ELISA se pot depista boli infecțioase (cauzate de micoplasme - micro-organisme procariote, gram negative; chlamidii; agentul sifilisului, *Heliobacter pylori,* virusul Epstein Barr), cancere sau boli autoimune prin utilizarea anticorpilor prezenți în sistemul circulator sau/și a antigenilor țintă. Un exemplu de proteină implicată în răspunsul umoral la cancere este NY-ESO-1, care apare în exces la o varietate de cancere incluzând melanomul. Anticorpii serici pentru această proteină pot fi detectați prin tehnica Western Blot sau ELISA. Autoanticorpii proteinelor defensină și calreticulină au fost evidențiați în cancerul de colon și pancreas. În cazul cancerului s-au identificat proteine care pot fi folosite drept indicatori (detectarea feritinei în cancerul de prostată). Bolile autoinflamatorii ca artrita reumatică se caracterizează prin prezența de anticorpi autoantigeni. Simptomele și severitatea acestor

boli pot fi corelate cu prezenţa acestor anticorpi şi cu localizarea în corp a complecşilor antianticorp-antiantigen.

Partea experimentală – Titrarea directă a antigenului cu anticorpul

A) Materiale

1. IgG din şoarece în PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 6,5 mM, K_2HPO_4 1,5 mM, pH 7.4) la 1 mg/ml;
2. Anti-IgG extrasă din capră conjugată cu AP (fosfataza alcalină);
3. Placă cu 96 godeuri;
4. Micropipete (2-20 µl şi 20-200 µl);
5. Soluţie tampon carbonat/bicarbonat, pH = 9.5, 0,05 M;
6. Soluţie 10% BSA, 0,05% Tween-20 (opţional) în PBS;
7. Soluţie de p-nitrofenil-fosfat 50 mM în Glicina 0,1 M, conţinând 1 mM Mg^{2+} şi 0.1 mM Zn^{2+} pH 10,5;
8. Acid sulfuric 1 M în apă;
9. Spectrofotometru multicanal.

B) Protocol

1. Se examinează placa astfel încât godeul A1 să fie situat în stânga sus;
2. Se pipetează 100 µl de tampon carbonat în fiecare godeu;
3. Se diluează soluţia de antigen (ser sanguin la diluţia maximă) în tamponul carbonat (1 ml soluţie în final);
4. Se adaugă 100 µl de antigen diluat la godeurile din coloana 1;
5. Se omogenizează amestecul din aceste godeuri prin pipetare. Se adaugă 100 µl din antigenul situat în godeurile din coloana 1 şi se transferă acest volum în coloana 2. Se amestecă soluţiile rezultate din coloana 2 şi se transferă din nou 100 µl de soluţie în godeurile din coloana următoare. Se continuă procedeul până se transferă 100 µl de soluţie din coloana 7 pe coloana 8;
6. Se acoperă placa şi se lasă la incubat 2 h la 37 ^{0}C sau la temperatura camerei (sau peste noapte la 4 ^{0}C).
7. Se aruncă conţinutul lichid din godeuri şi se spală de 4 ori cu PBS;
8. Se îndepărtează tamponul şi se întoarce placa pe o hârtie de filtru, pentru a îndepărta urmele de soluţie rămase.
9. Se diluează anticorpul (conjugat cu enzima) 1:200 în tamponul X (PBS conţinând 10% BSA, 0,05% Tween-20). Se adaugă 100 µl de

tampon X în fiecare godeu. Se adaugă câte 100 µl de conjugat în prima linie (A1-8). Se amestecă soluțiile rezultate. Se transferă 100 µl de conjugat din prima linie în cea de-a doua, iar după amestecare se transferă 100 µl de conjugat din soluția rezultată în linia următoare. Se repetă operațiunea până se ajunge la linia H. Se acoperă placa și se incubează timp de 1 h la 37 ^{0}C (sau temperatura camerei);

10. Se repetă pasul 7;

11. Se prepară un amestec: 50 mM p-nitrofenil-fosfat într-un tampon bazic. Se adaugă 200 µl soluție rezultată în fiecare godeu;

12. Se lasă placa pe masa de laborator și se observă evoluția în timp a reacției. După adăugarea substratului (5-10 min) se observă apariția culorii în colțul din stânga (A1);

13. După 2 h sau 5 h se citește absorbanța de pe godeuri, iar pentru stoparea reacției enzimatice se adaugă în fiecare godeu 50 µl de soluție de H_2SO_4 1M;

14. Se citește absorbanța din godeuri la spectrofotometru.

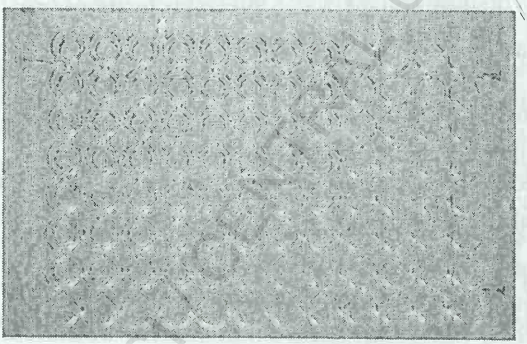


Figura 4.9. Identificarea IgG umane prin tehnica ELISA

Antigen-IgG din ser uman;
Anticorp-Anti-mouse IgG conjugată cu fosfataza alcalină
Linia A – Anticorp diluat 1:400
Linia B – Anticorp diluat 1:800
Linia G – Anticorp diluat 1:25600
Coloana 1 – Ser uman diluat 1:40
Coloana 2 – Ser uman diluat 1:80
Coloana 8 – Ser uman diluat 1:5120

Reacţia de recunoaştere a antigenului constă în transformarea substratului enzimei într-un produs de reacţie mai colorat (ionul nitrofenolat). Timpul de reacţie este de 5 h la temperatura camerei. Se va determina diluţia optimă pentru anticorpul conjugat pentru a putea detecta IgG din serul uman şi ce diluţie de IgG este optimă pentru determinările ulterioare. Trebuie luaţi în calcul următorii parametri: înălţimea platoului, reacţiile nespecifice, semnalele de fond şi curbele de titrare.

Întrebări:

1. Câte variante ale tehnicii ELISA cunoaşteţi?
2. Care variantă a tehnicii ELISA (directă sau indirectă) se realizează într-un număr mai mic de etape?
3. Ce componenţi concurează în cazul tehnicii ELISA competitivă?
4. Din ce motiv se impune stoparea reacţiei enzimatice în tehnica ELISA?
5. În testul ELISA se foloseşte un anticorp cu concentraţia 0,5 mM. Soluţia anticorpului trebuie diluată la 50 μM, 5 μM respectiv 50 pM. Care este factorul de diluţie în cele trei situaţii?

Bibliografie:

1. Crowther, J.R. (2009), The ELISA Guidebook (second edition), Humana Press.
2. Holtzhauer, M. (2006), Basic Methods in Biochemical Lab (first english edition), Springer, p.157-160.
3. Allen, G. (1989), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Burdon R.H., Van Knippenberg P.H., eds), Vol. 9, Elsevier North Holland, Amsterdam.
4. Taylor, S. (2006), The nature of food allergy (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., eds) Detecting allergens in food, CRC Press, Boca Raton and Woodhead Publishing Ltd, USA, England.
5. Kindt, T.J., Osborne B.A. şi Goldsby R.A. (2006), Kuby Immunology, 6th edition, W.H. Freeman and Co.
6. Janeway, T., Travers, P. şi Walport M. (2001), Immunobiology: The immune system in health and disease (5rth Edition), Gerald Publishing, NY.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI
CHIMIE

7. Parslow, T.G., Stites, D.P. şi Imboden, J.B. (2001), Medical Immunology (10th Edition), McGraw Hill, NY.
8. Roitt, I.M, Brostoff, J. şi Male, D. (2001), Immunology (6th Edition), McGraw-Hill/Appleton & Lange.
9. Lydyard, P., Whelan, A. şi Fanger, M.W. (2004) Instant notes in immunology (2th Edition), Garland Science/ BIOS Scientific Publisher Limited, NY.
10. Krakauer, T., Ed. (2003), Superantigen protocols, In Methods in molecular Biology, Vol 214, Humana Press.
11. Cucoş, R., Bohaltea, L., Raicu, F. şi Neagis, D. (2006), Metode şi principii în genetică moleculară, Editura Medicală, Bucureşti, p. 146-149.

4.4. Separarea ADN-ului prin electroforeză

Electroforeza în geluri de agaroză reprezintă metoda standard de analiză a acizilor nucleici. Deplasarea moleculelor se face în prezența unui curent electric (acizii nucleici sunt încărcați negativ datorită prezenței grupărilor fosfat şi migrează spre electrodul încărcat pozitiv). Mobilitatea electroforetică este influențată de următorii factori: concentrația de agaroză, conformația moleculei de ADN (monocatenar, bicatenar sau superrăsucit), prezența compusului fluorescent în gel, tamponul utilizat, tipul de agaroză şi voltajul aplicat.

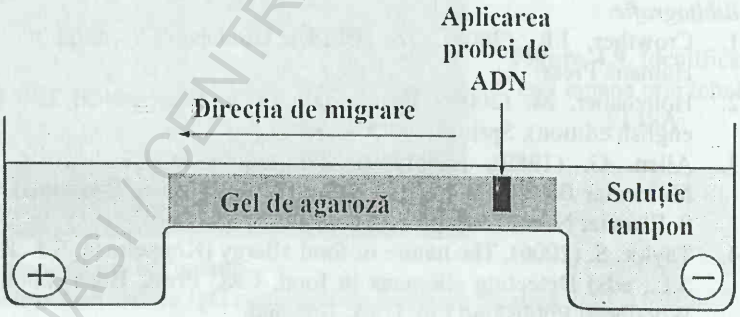


Figura 4.10. Tehnica de separare a acizilor nucleici prin electroforeza orizontală (de tip submarin)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica se foloseşte pentru determinarea purităţii ADN-ului sau ARN-ului, la verificarea existenţei produşilor rezultaţi în urma PCR-ului (reacţie de polimerizare a nucleotidelor) sau la analiza fragmentelor rezultate după clivarea enzimatică (cu ajutorul enzimelor de restricţie) a ADN-ului. Fragmentele analizate pot avea mărimi între 1000 şi 23000 pb (pb – perechi de baze). Unul dintre avantajele acestei tehnici este acela că ADN-ul nu este denaturat, păstrându-şi intacte elementele structurale. Pentru a evita fragmentarea ulterioară a ADN-ului manipularea trebuie făcută în aşa fel încât să se evite contaminarea cu amprente, picături, salivă sau microorganisme. Din acest motiv se preferă utilizarea de materiale sterile (vârfuri etc.).

Cele mai folosite sisteme tampon (pH 8) pentru electroforeza în geluri de agaroză sunt: TAE (Tris-acetat 40 mM, EDTA 1 mM), TBE (Tris – borat 45 mM, 1 mM EDTA), TPE (Tris-fosfat 90 mM, EDTA 2 mM). Soluţiile tampon pentru electroforeză se păstrează sub forma unor stocuri concentrate (10X-50X) şi păstrate la temperatura camerei.

Tamponul de încărcare are în componenţă un colorant (albastru de bromfenol sau roşu de crezol 0,25%) care permite vizualizarea frontului de migrare şi zaharoză (40%) sau glicerină (30%) pentru a asigura o vâscozitate corespunzătoare la aplicarea probei.

Benzile sunt vizualizate cu compuşi fluorescenţi (bromura de etidiu sau SYBR Green) prin iradiere cu lumină UV. Sensibilitatea variază între 100 pg şi 1 ng/bandă. Datorită faptului că aceşti coloranţi se intercalează între bazele ADN-ului dublu catenar, sensibilitatea detecţiei depinde de lungimea lanţului acizilor nucleici.

Modul de lucru

- Se toarnă gelul (0,3-3% agaroză în TBE; TBE-tampon) în camera de separare; în prealabil se plasează două distanţatoare din material plastic care permit delimitarea gelului;
- Se încălzeşte amestecul timp de 60 secunde într-un cuptor cu microunde;
- Se răceşte soluţia la 50 °C (temperatura este controlată cu ajutorul unui termometru digital) şi se adaugă 0,5 µl bromură de etidiu de concentraţie 1 mg/ml (substanţa fluorescentă care complexează în

special cu ADN-ul duplex permițând vizualizarea fragmentelor de ADN separate);

Atenție! Bromura de etidiu este un compus neurotoxic! Se manipulează numai folosind mănuși!

- Se așază pieptenele la o distanță de 1 cm de camera în care se află așezat electrodul încărcat negativ, după care se toarnă amestecul răcit la 50 °C și se așteaptă cca 20 minute, timp în care gelul se solidifică;
- Se îndepărtează distanțatoarele din plastic și pieptenele;
- Se acoperă gelul cu soluție tampon (TBE) aproximativ 2-3 mm.
- Se aplică probele de analizat (suspendate în soluția tamponului de încărcare) și probele de referință (amestec de molecule de ADN cu dimensiuni cunoscute – soluție standard 100 pb și 1 Kb);
- Se lasă probele la migrat timp de 40 min la 90 V și 75 mA;
- Se îndepărtează soluția tampon, se vizualizează benzile separate prin excitare la 254 nm (la întuneric);
- Fragmentele de ADN separate pot fi eluate prin tăierea gelului și utilizate pentru purificare sau clivare (cu enzime de restricție) sau pot fi transferate pe membrane (tehnica Southern blot).
- Gelurile pot fi redizolvate la cald în tamponul de migrare și reutilizate de 5-6 ori.

Întrebări:

1. Electroforeza este:
a) procesul de separare a fragmentelor ADN;
b) procesul de adăugare de noi nucleotide la ADN cu ajutorul câmpului electric;
c) procesul de replicare al fragmentelor de ADN în câmp electric;
d) nici un răspuns.
2. Ce se întâmplă cu lanțurile de ADN de aceeași lungime:
a) se deplasează cu aceeași viteză și se plasează în zone diferite;
b) se deplasează cu aceeași viteză și se grupează în aceeași zonă;
c) se deplasează cu viteze diferite și se grupează în aceeași zonă;
d) nu se deplasează.

3. Ce compus este utilizat pentru developarea gelurilor în care se separă fragmentele de ADN:
   a) agaroză; b) poliacrilamidă; c) glicerină; d) bromura de etidiu.
4. Electroforeza poate fi aplicată pentru separarea:
   a) lipidelor; b) proteinelor; c) zaharurilor; d) acizilor nucleici.
5. Un amestec de proteine este supus electroforezei (în condiţii native sau denaturante) înaintea folosirii tehnicii Western Blot. Ce metodă electroforetică se foloseşte în scopul localizării complecşilor proteici? Dar în situaţia detecţiei unei singure proteine?
6. Din ce motive se utilizează albastru de bromfenol la electroforeza acizilor nucleici?
7. Un fragment de ADN liniar a fost tăiat cu o enzimă de restricţie. Ţinând cont de faptul că ADN-ul are două situsuri de legare susceptibile la clivarea cu această enzimă, identificaţi numărul de fragmente separate prin electroforeză după clivare.

Bibliografie:

1. Rickwood, D. şi Hames, B.D. (eds.) (1984) Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach. IRL Press, Oxford.
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., vol. 1, chap. 6, Cold SpringHarbor Laboratories Press.
3. Jany, K.-D. şi Hahn, H. (1991) In: Bertram S, Gassen G (eds.) Gentechnische Methoden. pp. 39-43. Fischer, Stuttgart.
4. Westermeier, R. (2005), Electrophoresis in practice, 4th ed., Willey, Weinheim, Germany.
5. http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab6/analysis2.html
6. http://www.dnalc.org/resources/animations/gelelectrophoresis.html

4.5. Reacţia de polimerizare în lanţ

Geneticienii au înţeles faptul că sunt necesare mai multe componente pentru a realiza replicarea ADN-ului. În acest scop este nevoie de o enzimă numită *ADN polimeraza* şi de dezoxinucleotide care constituie „cărămizile" de bază ale ADN-ului.

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) este o reacție enzimatică de amplificare mediată de primeri (secvențe scurte de ADN) specifici secvențelor de ADN genomic sau clonat. Metoda PCR a fost inventată de Karry Mullis în 1983 și implică utilizarea unor perechi de oligonucleotide (de obicei 20-25 pb) și a unei ADN polimeraze termostabile, cele mai utilizate fiind Taq, Pfu sau Pwo polimeraza. ADN-ul matriță conține secvența țintă, care poate avea de la zeci sau sute la zeci de mii de nucleotide lungime. Tehnica PCR standard realizează amplificarea unei singure secvențe de ADN care are o lungime de cel puțin 5 Kb. *Long PCR* este tehnica prin care se pot amplifica fragmentele de până la 40 Kb. A treia variantă de PCR, *multiplex PCR*, este utilizată pentru amplificarea unor secvențe multiple care au o lungime de sub 5 Kb. Taq polimeraza catalizează reacția într-un sistem tampon, în care există un exces de perechi de primeri și cele patru fosfat-deoxinucleotide (dNTP), generându-se astfel milioane de copii ale secvenței țintă. Tehnica PCR poate fi utilizată și pentru amplificarea secvenței de ARN, care trebuie convertită inițial în ADN de către enzima revers transcriptaza. Spre deosebire de ADN trebuie luată în considerare instabilitatea și susceptibilitatea ARN-ului la degradare.

ADN-ul utilizat ca matriță pentru PCR poate proveni din diferite surse: sânge liofilizat, salivă, țesut parafinat, păr. De asemenea, reacția PCR poate fi utilizată pentru amplificarea ADN-ului din materialele degradate: mumii sau fosile.

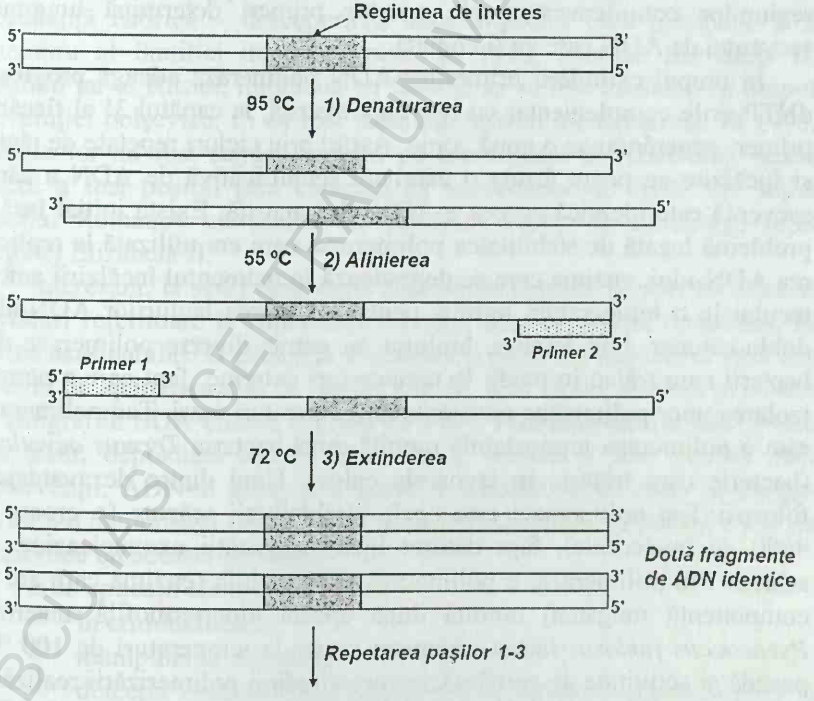
Replicarea ADN-ului in vitro – reacția PCR

Reacția PCR este constituită din serii de trei pași esențiali care definesc un ciclu PCR: denaturarea ADN-ului matriță dublu catenar, alinierea perechilor de primeri la matrițele de ADN monocatenar și extensia enzimatică a primerilor, prin care se produc copii care servesc ca matrițe în ciclurile ulterioare. ADN-ul matriță este suspendat într-un amestec alcătuit din apă distilată, soluție tampon (ce conține clorură de magneziu), Taq polimeraza și cele patru dNTP. De asemenea există o pereche de primeri a căror secvențe sunt complementare cu cele ale ADN-ului care flanchează regiunea țintă.

Pentru construirea primerilor se iau în considerare următorii parametri:
- trebuie să aibă un conținut de baze în jur de 50% GC;
- lungimea trebuie să fie între 15-30 pb;
- cei doi primeri trebuie să nu formeze duplexuri între ei;
- trebuie evitați primerii care conțin bucle;
- capătul 3' trebuie să prezinte o complementaritate perfectă cu secvența ADN-ului țintă;
- temperatura de aliniere a primerilor să fie între 50-64°C;
- temperatura la care jumătate din molecule sunt monocatenare și cealaltă jumătate bicatenare este temperatura de topire (Tm).

Temperatura de topire poate fi aproximată după formula:

2 x (număr de baze A/T) + 4x (număr de baze C/G)



Schema 4.11. Etapele reacției PCR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Temperatura de aliniere a primerilor este de obicei aleasă cu 5 °C mai scăzută decât temperatura de topire. Din acest motiv este foarte importantă alegerea temperaturii de topire a celor doi primeri (vezi OligoAnalyzer, http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/ oligoanalyzer/; http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/ demo.php; diverse servere pentru estimarea valorii temperaturii de topire T_m http://protein.bio.puc.cl/cardex/servers/melting/sup_mat/servers_list.html). Amestecul de reacție este mai întâi încălzit la temperatura de 94 °C pentru denaturarea (separarea) catenelor duble de ADN (Schema 4.11.) și apoi răcit la o temperatură optimă care facilitează alinierea (alipirea acestora la secvența de ADN) primerilor. Primerii sunt orientați unul în amonte și unul în aval față de regiunea ce urmează a fi amplificată, ambii cu capătul 3' spre interiorul secvenței țintă. Poziția relativă a regiunilor complementare ale acestor primeri determină lungimea secvenței de ADN care va fi copiată.

În timpul extinderii primerilor ADN polimeraza adaugă progresiv dNTP-urile complementar cu secvența matriță, la capătul 3' al fiecărui primer, generându-se o nouă copie. Astfel prin cicluri repetate de răcire și încălzire se poate forma o cantitate semnificativă de ADN a cărui secvență este identică cu cea a ADN-ului matriță. Exista inițial însă o problemă legată de stabilitatea polimerazei care era utilizată la replicarea ADN-ului, enzima care se degradează în momentul încălzirii amestecului la o temperatură optimă pentru separarea lanțurilor ADN-ului dublu-catenar. Din fericire, biologii au extras diverse polimeraze din bacterii care trăiau în medii la temperaturi extreme, fapt care a permis izolarea unor polimeraze rezistente la temperaturi mari. Taq polimeraza este o polimeraza termostabilă numită după bacteria *Termus acvaticus* (bacterie care trăiește în izvoarele calde). Unul dintre dezavantajele folosirii Taq polimerazei este acela al fidelității scăzute (o eroare la 9000 de nucleotide), fapt datorat lipsei activității exonucleazice. În schimb Pfu polimeraza, o polimerază termostabilă (enzimă care are în componență tungsten) numită după specia hipertermofilă anaerobă *Pyrococcus furiosus* (acest organism crește la temperaturi de 100 °C) posedă și activitate de verificare a corectitudinii polimerizării realizând astfel o amplificare cu un grad de fidelitate ridicat a secvenței ADN

dorite. Pwo polimeraza a fost izolată din archeobacteria hipertermofilă *Pyrococcus woesei.*

Cele aproximativ 30 de cicluri sunt realizate într-un aparat optimizat să oscileze temperatura pe diferite intervale de timp, numit *thermal cycler*. Numărul de cicluri PCR trebuie optimizat în funcţie de numărul de copii ţintă dorit. Pornindu-se de la o singură copie, cea mai eficientă reacţie de PCR atinge în câteva ore un platou în 35-40 de cicluri de amplificare). Acest proces este denumit PCR deoarece în decursul fiecărui ciclu cantitatea de ADN se dublează. Mărimea fragmentului de ADN copiat rezultat în urma PCR este controlată prin intermediul electroforezei în geluri de agaroză.

Aplicaţii ale tehnicii PCR

Unul din exemplele elocvente ale aplicabilităţii PCR-ului are rezonanţă istorică – descoperirea unui impostor care pretindea a fi membru al familiei imperiale ruse. În 1918, Nicolae Romanov II, ultimul ţar al Rusiei, împreună cu familia sa au fost asasinaţi în timpul revoluţiei bolşevice. Ei au fost înhumaţi într-un loc nemarcat. În 1993, oasele lor au fost supuse testului de identificare al ADN-ului. Acest lucru a fost posibil prin compararea secvenţelor de ADN ale soţiei ţarului Romanov cu acelea ale prinţului Philip de Edinburg, soţul reginei Elizabeta II.

Interesant, la scurt timp după asasinarea familiei regale, au circulat zvonuri referitoare la supravieţuirea unei fiice a ţarului, Anastasia, în urma asasinatului. O persoană a convins o parte din nobilimea rusă din Berlin de apartenenţa sa la familia regală. Mai târziu, această persoană a emigrat în SUA unde a decedat în 1984. Prin intermediul unei probe de ţesut, depozitată într-un spital unde aceasta a fost supusă unei intervenţii, ADN-ul acesteia a putut fi amplificat. În urma investigaţiilor s-a demonstrat faptul că împărăteasa Alexandra şi prinţul Filip nu sunt rude cu această persoană.

Alte aplicaţii ale reacţiei PCR:

- în criminalistică;
- manipularea genetică;
- detecţia virusului HIV (ADN-ul este izolat din celulele roşii şi amplificat cu primeri corespunzători secvenţelor HIV);

- diagnosticare prenatală a bolilor genetice.

Partea experimentală

Materiale

- Matrița ADN (genomic, plasmid, cosmid, o colonie bacteriană sau de drojdie);
- Primerii (suspendați la o anumită concentrație în tampon TE sau apă Millipore sterilă);
- Tampon (de concentrație 10x, de obicei este livrat împreună cu polimeraza corespunzătoare);
- Soluție $MgCl_2$ 25 mM;
- Polimeraza (Taq);
- Amestec de deoxinucleotide 20 mM (dNTP);
- Apă Millipore sterilă;
- Mănuși;
- Vârfuri sterile.

Aparatura

Dispozitiv PCR (dispozitiv care permite programarea unor cicluri de temperatură).

Modul de lucru

1. În tuburi Eppendorf de 200 µl se pipetează în ordine:
   - 5 µl tampon (10x);
   - 1 µl soluție NTP 20 mM;
   - 2,5 µl soluție primer 1 de concentrație 20 µM (100 pM concentrația finală);
   - 2,5 µl soluție primer 2 de concentrație 20 µM (100 pM concentrația finală);
   - 28 µl apă Millipore sterilă;
   - 1 µl ADN polimeraza cu activitate 1-5 U/l;
   - ADN-ul matriță 10 µl (ADN genomic uman 100 µg/ml; ADN din drojdie 1 µg/ml; ADN genomic bacterian 0,1 µg/ml sau plasmid 1-5 ng/ml).

Concentrația $MgCl_2$ poate influența reacția de amplificare. De obicei concentrația poate varia de la 1 la 6 mM. În majoritatea cazurilor soluția tampon conține $MgCl_2$ 1,5 mM.

BCU TARGU MUREȘ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Tuburile care conţin amestecul de reacţie dorit se agită cu ajutorul unui Vortex pentru câteva secunde şi se aşează în lăcaşurile aparatului;
3. Amplificarea acizilor nucleici se face după următorul ciclu:

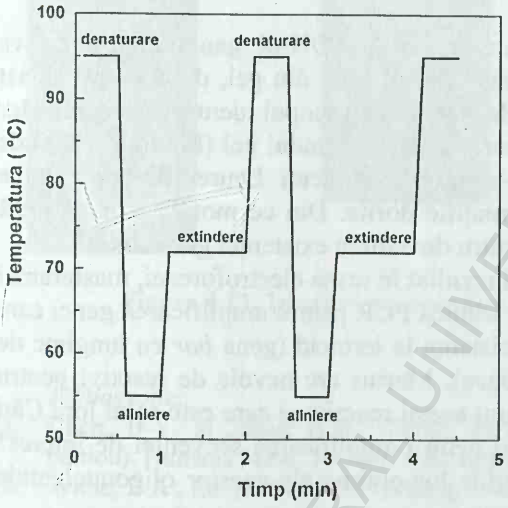
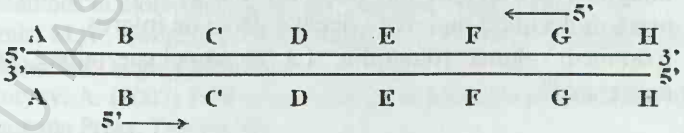


Figura 4.12. Variaţia temperaturii în decursul unei reacţii PCR

4. 5-10 µl de probă va fi supusă electroforezei în geluri de agaroză

Întrebări

1. Reacţia de polimerizare în lanţ (PCR) este folosită pentru a amplifica un segment ADN dublu helix (care are segmentele, A-B,



B-C etc. a câte 100 perechi de baze fiecare):
Reprezentaţi grafic primele 4 cicluri ale reacţiei PCR. Câte segmente de ADN duplex rezultă după cele 4 cicluri?

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. În laboratorul de biochimie, Marius şi Laura, doi studenţi de la master, încearcă să ajute un agricultor pentru a pune în evidenţă gena *bar,* din plantele modificate genetic, genă care conferă rezistenţă la un ierbicid. Pe parcursul experimentelor, ei întâmpină o serie de probleme. Încercaţi să explicaţi din ce motiv experimentul lor nu funcţionează.
   a) În prima fază, Laura a izolat ADN-ul genomic din câteva seminţe. Ea a separat ADN-ul total din gel, după ce a incubat ADN-ul cu enzime de restricţie în scopul identificării cerealelor care prezintă gena *bar.* Pe baza primului gel (Figura 4.13, unde S-soia, R-rapiţă, P-porumb), explicaţi Laurei din ce motive gelul nu oferă informaţiile dorite. Din ce motive tehnica PCR este mai adecvată pentru dovedirea existenţei genei *bar*?
   b) După analiza gelului rezultat în urma electroforezei, masteranzii au decis să utilizeze tehnica PCR pentru amplificarea genei care conferă plantelor rezistenţa la ierbicid (gena *bar* cu lungime de 300 de perechi de baze). Marius are nevoie de reactivi pentru reacţia PCR. Care sunt aceşti reactivi şi care este rolul lor? Câţi primeri sunt necesari pentru amplificarea secvenţei de interes? Care sunt concentraţiile lor optime ale acestor oligonucleotide în soluţie?
   c) Înainte de electroforeză Marius a adăugat apă în camerele dispozitivului de separare şi a conectat sistemul la sursa de electricitate. După migrare Marius a examinat al doilea gel prin iradiere cu o lampă UV. Din ce motive nu a avut loc migrarea?
   d) În ultima etapă cei doi studenţi au mărit cantitatea de ADN din reacţia PCR şi după electroforeza probelor rezultate au obţinut imaginea din dreapta jos. Explicaţi din ce motiv apar benzi cu masă moleculară mai mare decât a genei de interes.
   e) Examinaţi ultima fotografie. La ce concluzie ajung cei doi masteranzi?

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

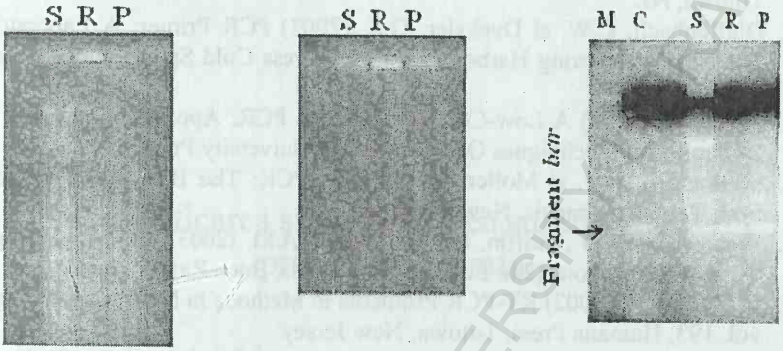


Figura 4.13. Tentative de separare a ADN-ului prin electroforeză

Bibliografie:

1. Chen, B-Y. şi Janes, H.W. (2002), PCR Cloning Protocols (second edition), Humana Press, Totowa, New Jersey.
2. White, B.A., Ed. (1997), PCR Cloning Protocols. From Molecular cloning to genetic Engineering (Methods in Molecular biology) (first edition), Humana Press, Totowa, New Jersey.
3. Flaman, J-M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S. H. A. şi Iggo, R. (1994) A rapid PCR fidelity assay. *Nucleic Acid Research,* **22 (15)**, 3259-3260.
4. Pelt-Verkuil, E., Belkum, A. şi Hay, J.P. (2008) Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer.
5. Reischl, A. şi Kochanowski, B. (1999) Quantitative PCR Protocols (Methods in molecular medicine), Humana Press, Totowa, NJ.
6. Innis, M.A., Gelfand, D.H şi Sninsky, J. (1995) PCR strategies, Academic Press, San Diego, California.
7. Yuryev, A. (2007) PCR primer design in Methods in molecular medicine, Humana Press, Totowa, NJ.
8. Rapley, R. (2008) PCR sequenching protocols in Methods in molecular medicine, Humana Press, Totowa, NJ.

9. Lo, Y.M.D., Chiu, R.W.K. şi Chan, K.C.A (Methods in molecular Biology) (Second Edition) Clinical applications of PCR, Humana Press, Totowa, NJ.
10. Dieffenbach, C.W. şi Dveksler, G.S. (2003) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.
11. Harris, E. (1998) A Low-Cost Approach to PCR: Appropiate Transfer of Biomolecular Techniques Oxford: Oxford University Press.
12. McPherson, M.J. şi Moller, S.G. (2006) PCR: The Basis (2nd Edition) from Taylor & Francis, New York.
13. Weissensteiner, T., Griffin, H.G. şi Griffin, A.M. (2003) PCR Technology: Current Innovations (2nd Edition) CRC Press, Boca Raton, Florida.
14. O'Connell, J. (2002) RT-PCR Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 193, Humana Press, Totowa, New Jersey.
15. Bunse, A., şi colab. (2005) Prakticum der Molekulargenetik, Springer-Verlag, Berlin.
16. Pagini web cu informaţii despre PCR:
    a. Animaţii 2D şi 3D ale tehnicii PCR
    http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html
    http://www.dnalc.org/view/15475-The-cycles-of-the-polymerase-chain-reaction-PCR-3D-animation-with-no-audio.html
    http://www.maxanim.com/genetics/PCR/PCR.htm
    http://www.scanelis.com/webpages.aspx?rID=679
    b. Aplicaţii şi dificultăţi ale tehnicii PCR
    http://www.bio.uio.no/bot/ascomycetes/PCR.troubleshooting.html
    http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html
    http://www.molecularstation.com/forum/real-time-pcr-quantitative-pcr-forum/
    c. Exemple experimentale de efectuare a reacţiei PCR
    http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/PCR/Real-Time_PCR/
    http://www.addgene.org/pgvec1?f=v&cmd=showfile&file=prot_pcr
    http://www.le.ac.uk/bl/phh4/PCR.htm

BCU

Capitolul 5

Purificarea şi identificarea substanţelor prin cromatografie

Toate tipurile de cromatografie se bazează pe interacţiunea fizică a moleculelor de analizat/separat cu două faze (mobilă respectiv staţionară). Componentele din amestecul de separat sunt distribuite între cele două faze (reacţionând în special cu faza staţionară). Faza mobilă poate fi colectată în timp la capătul sistemului cromatografic.

În funcţie de cantitatea de material biochimic supus separării cromatografia poate fi analitică sau preparativă. Cromatografia analitică este folosită la determinarea purităţii probelor sau pentru evaluarea unor caracteristici ale moleculelor de analizat. Cromatografia preparativă este aplicată pentru purificarea cantităţilor mai mari de produs (de la miligrame la grame) din probele biochimice.

5.1. Cromatografia în strat subţire

Cromatografia în strat subţire sau cromatografia planară este o cromatografie de partiţie, în care compuşii dintr-un amestec sunt separaţi pe baza solubilităţii lor într-un amestec de solvenţi respectiv pe baza interacţiunilor acestora (forţe de tip London sau van der Waals, interacţii dipol-dipol, legături de hidrogen intermoleculare) cu faza staţionară (suprafaţă cromatografică planară).

Deşi munca de pionierat pentru acest tip de separare a fost atribuită lui Beyerinck (1889) şi lui Wijsmann (1896), principiile teoretice şi experimentale ale cromatografiei în strat subţire au fost formulate de

către Izmailov şi Wijsmann. Prima separare a terpenelor a fost realizată de Kirchner şi colaboratorii (1951). La sfârşitul anilor '50 Stahl a demonstrat faptul că această metodă poate fi aplicată la diferite separări.

Faza staţionară este suportul cromatografic (silicagelul, oxidul de aluminiu, kieselgurul, fluorisil – silicat de magneziu, hidroxidul de magneziu, pulberea de celuloză, poliamidele – vezi Tabelul 5.1) care absoarbe apa. Dimensiunea particulelor este în general între 10-25 μm.

Tabelul 5.1. Tipuri de suporturi cromatografice utilizate în cromatografia în strat subţire

Faza staţionară	**Aplicaţii în separarea biomoleculelor**
Silicagel	Aminoacizi, alcaloizi, zaharuri, acizi graşi, lipide, steriozi, terpenoide
Alumina	Alcaloizi, steroli, vitamine, carotenoide, aminoacizi
Kiselguhr	Zaharuri, oligozaharide, acizi graşi, trigliceride, aminoacizi, steroli
Celita	Steroide
Celuloza / schimbători de ioni	Nucleotide
Amidon	Aminoacizi
Poliamida	Antioxidanţi, flavonoide, proteine
Sephadex	Nucleotide, proteine

Profilul separării în cromatografia în strat subţire poate fi modificat prin schimbarea compoziţiei fazei mobile (amestecului de solvenţi). Alegerea eluantului este determinată de procesul de sorbţie şi de natura componenţilor din probă. Polaritatea solvenţilor poate fi obţinută din seriile eletropice în care aceşti solvenţi sunt aranjaţi în ordinea creşterii polarităţii (constantei dielectrice, Tabel 5.2). În general este de preferat o fază mobilă în care amestecul de solvenţi are polaritatea mai mică şi conduce la o rezoluţie bună a separării.

În partea experimentală este descrisă o separare cromatografică în strat subțire de tip ascendent. Separarea cromatografică se va realiza într-un tanc de sticlă, acoperit cu un capac (pentru a avea o atmosferă saturată în solvent).

Tabel 5.2. Seria eluotropică a solvenților la 25 °C

Solvent	Constantă dielectrică	Solvent	Constantă dielectrică
Hexan	1,89	**Tetrahidrofuran**	7,58
Ciclohexan	2,02	**CH_2Cl_2**	9,14
1,4-Dioxan	2,21	**Alcool tertbutilic**	10,9
CCl_4	2,24	**Piridina**	12,3
Benzen	2,28	**Butan-2-ol**	15,8
Toluen	2,38	**2-Metilpropan-1-ol**	17,7
Acetonitril	3,88	**n-Butanol**	17,8
Dietileter	4,34	**Alcool izopropilic**	18,3
$CHCl_3$	4,87	**n-Propanol**	20,1
Acid formic	5,0	**Acetonă**	20,7
Alcool izoamilic	5,82	**Etanol**	24,3
Acetat de etil	6,02	**Metanol**	33,6
Acid acetic	6,15	**Apă**	78,3

Pentru separarea cromatografică a aminoacizilor se utilizează straturi de silicagel, alumină sau celuloză (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Amestecuri de solvenți folosite la separarea aminoacizilor pe diverse suporturi

Faza staționară	Procesul de sorbție	Amestec de solvenți
Silica	Adsobție	$BuOH/AcOH/H_2O$ (4:1:1)
Alumina	Adsobție	$BuOH/EtOH/H_2O$
Celuloza	Partiție	$BuOH/AcOH/H_2O$ (60:15:25)
PEI-celuloza	Schimbător ionic	0,01-1 M soluție NaCl

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Detecția componentelor necolorate aflate pe fiecare linie a plăcii cromatografice se poate face prin diferite metode: fluorescență, radioactivitate sau folosirea unor compuși care să permită colorarea. Vizualizarea plăcilor este facilitată în cazul folosirii plăcilor cu conținut de zinc fluorescent prin iradierea acestora cu o lampă cu vapori de mercur, situație în care apar spoturi care absorb radiațiile excitate pe placa fluorescentă. Substanțele care prezintă sisteme de conjugare extinse pot fi detectate prin fluorescență folosind o lampă UV. Există două tipuri de compuși care permit colorarea spoturilor în cromatografie: universali și specifici. Compușii universali permit obținerea de spoturi colorate pentru toți compușii organici aflați în amestecul de analizat. În cazul în care plăcuța cromatografică este plasată într-o cameră acoperită în care, în prealabil, s-au introdus 3-4 cristale de I_2 vaporii acestei substanțe vor reacționa cu substanțele organice de pe plăcuță producând pete galben-maronii (a căror intensitate depinde de timpul de expunere sau de gradul de nesaturare al compușilor).

O altă variantă de developare constă în pulverizarea plăcii cromatografice cu acid sulfuric concentrat sau acid fosfomolibdic (5% în etanol) și încălzirea la peste 100 °C pentru câteva minute, spoturile rezultate fiind de culoare neagră. 2,7-Fluoresceina poate fi utilizată pentru majoritatea compușilor organici permițând colorarea spoturilor în galben-verde. Reactivii specifici permit identificarea unei clase de compuși. Dacă ninhidrina este utilizată la detecția aminoacizilor, ftalat anilina la detecția carbohidraților, clorura de stibiu la detecția vitaminelor și a carotenoidelor, albastru de bromfenol sau albastru de bromcresol la identificarea resturilor carboxil, rodamina B este folosită la vizualizarea lipidelor.

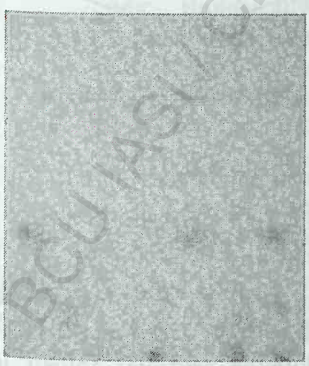
Un parametru important calculat după separarea cromatografică este factorul de retenție, R_f, valoare care indică deplasarea relativă a unui component din amestecul de separat față de frontul solventului) al fiecărui compus.

$$R_f = \frac{\text{Distanta parcursa de compus}}{\text{Distanta parcursa de frontul solventului}}$$

Factorul de retenție R_f are valori cuprinse între 0 și 1. Factorii de retenție depind de temperatura, grosimea stratului, gradul de saturare cu solvent din camera de separare, mărimea probei, tipul de fază mobilă și staționară.

Separarea aminoacizilor prin cromatografie în strat subțire

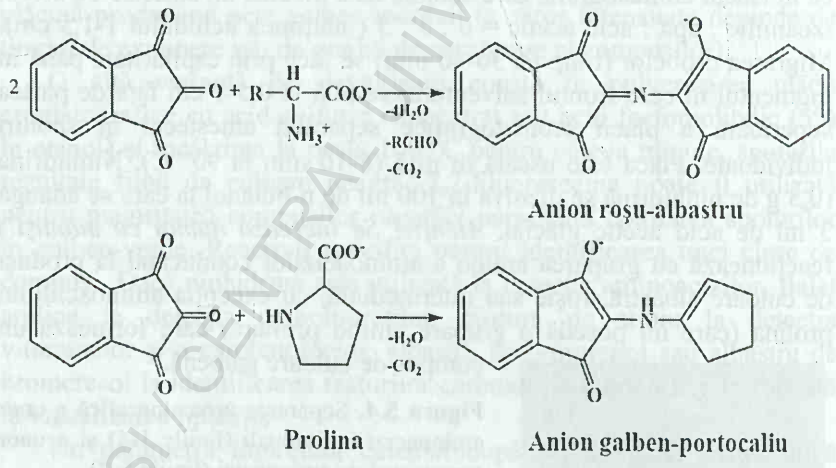
În lucrarea de față se folosește silicagel G, un produs de condensare a acidului ortosilicic, material ale cărui grupe active sunt grupările hidroxil. Acest tip de gel are în compoziție un liant ($CaSO_4 \cdot 1/2\ H_2O$) a cărui compoziție variază (5-15%). Pe placa cromatografică se trasează foarte ușor cu creionul linia de start la 1,5-2 cm de la baza plăcii. Se aplică 10 µl probă (aminoacid sau amestec de aminoacizi – concentrația aminoacizilor este 0.5 mg/ml) pe placa cromatografică și se așteaptă 5-10 min pentru evaporarea solventului în care s-a aflat proba de analizat sau martorul. După uscare, placa cromatografică se introduce în tancul cromatografic care conține faza mobilă, un amestec de alcool izoamilic : apă : acid acetic = 6 : 5 : 3 (înălțimea lichidului 1-1,5 cm). Migrarea probelor (timp de 30-40 min) se face prin capilaritate până în momentul în care frontul solventului se află la 0,5-1 cm față de partea superioară a plăcii cromatografice separând amestecul în spoturi individuale. Placa este uscată în nișă (5-10 min la 90 °C). Ninhidrina (0,3 g de ninhidrină se dizolvă în 100 ml de n-butanol la care se adaugă 3 ml de acid acetic glacial. *Atenție! Se lucrează numai cu mănuși!*) reacționează cu gruparea amino a aminoacizilor conducând la produși de culoare albastră, roșie sau intermediară, cu excepția aminoacidului prolina (care nu posedă o grupare amino primară) care formează un compus de culoare galbenă.



1 2 3 4 5 6 7

Figura 5.4. Separarea cromatografică a unor aminoacizi individuali (liniile 1-4) și a unor amestecuri de aminoacizi (liniile 5-7)
Faza staționară: Placa de aluminiu acoperită cu silicagel 60, Merck
Faza mobilă: alcool izoamilic : apă : acid acetic = 6 : 5 : 3
Aminoacizii standard sunt: fenil alanina, 4 µg (linia 1), acidul glutamic, 8 µg (linia 2), prolina, 8 µg (linia 3), arginina, 8 µg (linia 4).

Amestecurile de doi aminoacizi fenil alanina şi prolina (linia 5), respectiv acidul glutamic şi arginina (linia 6) se pot separa prin această metodă. În cazul separării celor 4 aminoacizi, prolina şi acidul glutamic deşi cu valori apropiate ale coeficienţilor de retenţie se disting prin diferenţele care apar între complecşii care aceşti aminoacizi îi dau cu ninhidrina (galben pentru prolină şi roşu aprins pentru acidul glutamic). Pentru a mări viteza reacţiei de identificare se încălzesc plăcile timp de 10 min la 110 °C. Se constată apariţia unor spoturi colorate caracteristice aminoacizilor. Se încercuiesc spoturile aminoacizilor identificaţi şi se măsoară factorul de retenţie. Se identifică aminoacidul (sau amestecul de aminoacizi) separat în funcţie de migrarea aminoacizilor standard.



Schema 5.5. Reacţia aminoacizilor cu ninhidrina. Reacţia prolinei cu ninhidrina este caracterizată prin formarea unui compus colorat în galben-portocaliu

Un exemplu de aplicaţie al cromatografiei în strat subţire al aminoacizilor este acela al identificării aspartamului (esterului metilic al dipeptidei aspartil-fenilalanina), un îndulcitor artificial folosit în

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITARĂ

industria alimentară. Prezența acestui îndulcitor poate fi dovedită prin reacția de hidroliză în prezența acidului clorhidric drept catalizator. Astfel se poate constata hidroliza aspartamului după procesul de procesare sau depozitare al băuturilor.

Întrebări:

1. În urma reacției unui aminoacid cu ninhidrina rezultă un compus de culoare galbenă. Identificați aminoacidul.
2. Scrieți structura următorilor aminoacizi: Phe (fenilalanina), Gly (Glicina), Ser (Serina) respectiv Lys (Lizina).
3. Ordonați aminoacizii Tyr, Phe, Gly, Glu în funcție de factorul de retenție.
4. Indicați o metodă alternativă de detecție a aminoacizilor aromatici după separarea cromatografică.

Bibliografie:

1. Bettelheim, F.A. şi Landesberg, J. (2000), Laboratory Experiments for general, organic, and biochemistry – 4th edition, Harcourt College Pub, p. 437-446.
2. Bezerinck, M.W.Z. (1889) *Phys. Chem.*, **3**, 110.
3. Iovu, M. şi Nicolaescu, T.O. (2009), Chimie organică. Metode experimentale, Ed. Carol Davila Bucuresti, p. 157-165.
4. Izmailov, N.A. şi Schraiber, M.S. (1938), *Farmatsiya,* **3**, 1.
5. Kirchner J.G., Miller, I.M. şi Keller, I.G. (1959), *Anal. Chem.*, **23**, 420.
6. Srivastava, S.P, Dua, V.K. şi Gupta, K. (1979), TLC Separation of Some Biologically Important Amino Acids on Pyridinium Tungstoarsenate Impregnated Layer, *Cromatographia,* **9**, 605-607.
7. Stahl, E. (1964) *Thin Layer Chromatography,* Martini-Bettolo, G. B. ed., Elsevier, London.
8. Wijsman, H.P. (1898), *dE Diastase, beschouwd als mengsel van Mattese endextrinase*, Amsterdam.

5.2. Cromatografia de schimb ionic

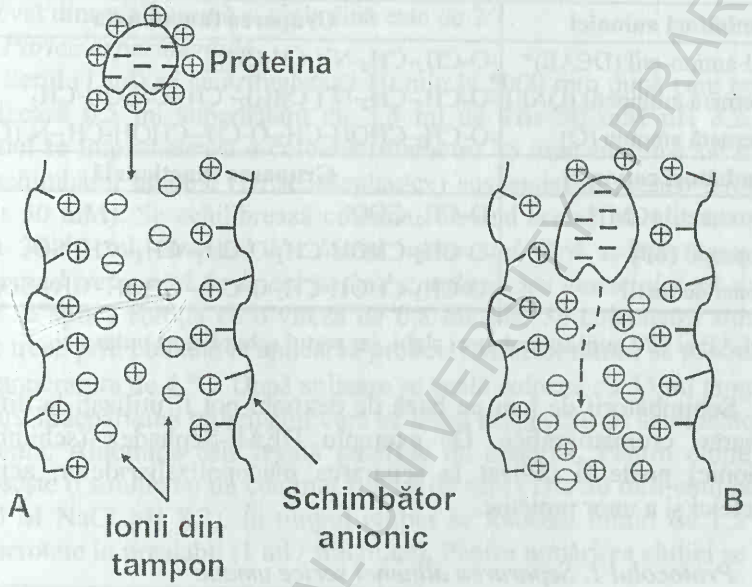
Acest tip de cromatografie este o cromatografie de absorbție în care analitul ionizat (proteina) interacționează prin forțe electrostatice reversibil cu o fază staționară (o matrice insolubilă din polistiren, pe

bază de rășini acrilice sau polizaharide – dextrani, agaroză sau celuloză pe care sunt grefate grupări funcționale ionizabile).

Punctul izoelectric al unei proteine (pH-ul la care sarcina netă totală este zero) depinde de proporția dintre grupările ionizabile aflate pe catena laterală a aminoacizilor din lanțul polipeptidic. Sarcinile pozitive sunt atribuite în general arginelor, lizinelor (pH > 8) sau histidinelor aflate în componența proteinelor. Capatul N-terminal al proteinelor este de asemenea încărcat pozitiv la valori de pH similare. Sarcinile negative sunt rezultatul ionizării grupărilor carboxilat din resturile de aspartat și glutamat (pH > 6; acil-CoA dehidrogenaza are ionizată în situsul catalitic o grupare glutamat în poziția 376). Mai mult, gruparea carboxil terminală din lanțul polipeptidic poate fi ionizată similar fiind încărcată negativ la pH neutru. La valori mari ale pH-ului (> 8) catena laterală a cisteinelor poate fi de asemenea ionizată. Ionizarea grupărilor din situsul catalitic al enzimelor poate varia în funcție de vecinătățile acestora. În cazul enzimelor intervine un alt aspect – domeniul de pH în care aceste molecule sunt stabile.

În cromatografia de schimb ionic se disting 3 etape:

a) Echilibrarea materialului (rășinii) astfel încât acesta să posede o anumită încărcare electrică astfel încât poate fi înconjurat de contraionii soluției tampon;
b) Aplicarea analitului de separat (cu încărcare opusă) pe rășină – tăria interacțiunii depinde de densitatea de sarcină a proteinei;
c) Proteinele legate pe coloană pot fi eluate utilizând o soluție tampon a cărei tărie ionică (concentrația în sare de până la 0,5 M pentru a elua majoritatea proteinelor; pentru îndepărtarea contaminanților și a acizilor nucleici după separare se utilizează o soluție tampon în care concentrația sării este de până la 1 M sau se utilizează un gradient de soluție alcoolică, soluție etanolică 20-70%) sau valoarea pH-ului diferă față de parametrii soluției tampon inițiale. Creșterea concentrației ionilor permite eluarea proteinei prin înlocuire, pe când descreșterea pH-ului permite în cazul unei rășini încărcate pozitiv reducerea sarcinii totale negative a proteinei și implicit eliberarea proteinei din coloană.



Schema 5.6. Reprezentarea schematică a cromatografiei de schimb ionic. A. Materialul cromatografic echilibrat cu soluția tampon; grupările de pe suport încărcate pozitiv sunt contracarate de anionii soluției tampon; B. Proteina încărcată negativ schimbă contraionii schimbătorului și absoarbe pe suprafața acestuia

Tipuri de rășini

Schimbătorii de ioni au în componență o matrice insolubilă pe a cărei suprafață sunt grefate grupări ionizabile. Un schimbător de ioni poate fi anionic sau cationic în funcție de ionii pe care îi schimbă, slab sau puternic în funcție de gradul de ionizare al grupelor funcționale grefate. Există o varietate de grupări folosite în cazul schimbătorilor de ioni (Tabel 5.7).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Tabel 5.7. Grupe funcționale ale schimbătorilor de ioni

Schimbători anionici	**Gruparea funcțională**
Dietil-amino-etil (DEAE)*	$-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_2$
Cuaternară aminoetil (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CH_2OH-CH_3$
Cuaternară amoniu (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Schimbători cationici	**Gruparea funcțională**
Carboximetil (CM)*	$-O-CH_2-COO^-$
Sulfopropil (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$
Sulfonat de metil	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-SO_3^-$

*DEAE şi CM sunt schimbători slabi, iar restul schimbători puternici.

Schimbătorii de ioni pe bază de dextrani pot fi utilizați la diferite separări cromatografice. De exemplu DEAE-Sephadex (schimbător anionic) poate fi utilizat la separarea mucopolizaharidelor, acizilor nucleici şi a unor proteine.

Protocolul 1. Separarea albumei serice umane

Noțiuni teoretice

Proteinele sunt unii dintre componenții majoritari din ser (lichid rezultat la îndepărtarea celulelor din sânge) ce posedă o multitudine de funcții în organism (hormoni, anticorpi, agenți anticoagulanți, agenți de transport, controlul presiunii osmotice sau pH-ului). Proteinele serice se divid în două grupuri mari, albumine şi globuline (4 tipuri importante).

Albumina este sintetizată în ficat pe baza proteinelor din dietă. Prezența acestei proteine în plasmă are rolul de a crea o presiune osmotică optimă pentru a menține un volum de fluid în spațiul vascular. Nivele scăzute ale concentrației albuminei pot indica probleme de sănătate (disabilități cronice, disfuncții ale ficatului sau rinichilor etc.).

Globulinele includ alături de γ-globuline (anticorpi), α-1 globuline, α-2 globuline, β-globuline şi o varietate de enzime şi proteine cu rol în transport. γ-Globulinele constituie fracțiunea majoritară a globulinelor şi din acest motiv un nivel scăzut al globulinelor poate fi asociat cu o

deficiență în anticorpi. α- şi β-Globulinele provin din ficat. Raportul adecvat dintre albumină şi globulină este de 2:1.

Partea experimentală

Serul (1 ml) se centrifughează 10 min la 5000 rpm după care omogenizează 0,5 ml supernatant cu 3,5 ml de Tris 50 mM pH 8.2. În paralel se împachetează o coloană (diametru 15 mm; înalțime 60 mm) cu schimbător anionic (DEAE-Sephadex) suspendat în acelaşi tampon (Tris 50 mM). Se echilibrează coloana folosind acelaşi soluție tampon (cca 30-40 ml; *Atenție! Nu lăsați materialul fără soluția tampon, tamponul trebuie să fie la cel puțin 1 cm deasupra materialului!*) după care se aplica soluția cu o viteză de 0,8 ml/min. Se colectează soluția care trece prin coloană la aplicarea probei. Extractul rămas se păstrează la temperatura de 4 °C. După aplicare se spală coloana cu 35 ml tampon pentru îndepărtarea proteinelor care se leagă nespecific de schimbătorul cationic. Albumina este legată puternic de material. Pentru eluție se foloseşte o soluție cu un conținut ridicat de sare (Tris 50 mM conținând 0,50 M NaCl pH 8,2). În timpul eluției se folosesc tuburi de 1,5 ml numerotate în prealabil (1 ml / fracțiune). Pentru urmărirea eluției se

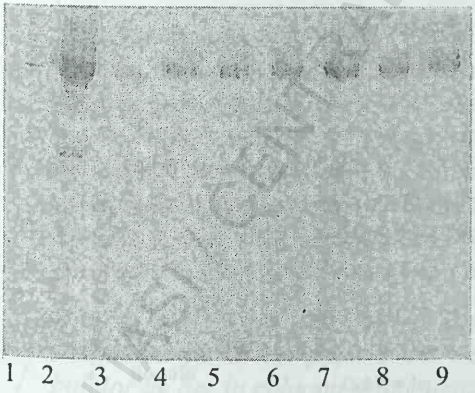


Figura 5.8. Purificarea parțială a albuminei serice umane prin cromatografie de schimb ionic (DEAE-Sephadex)

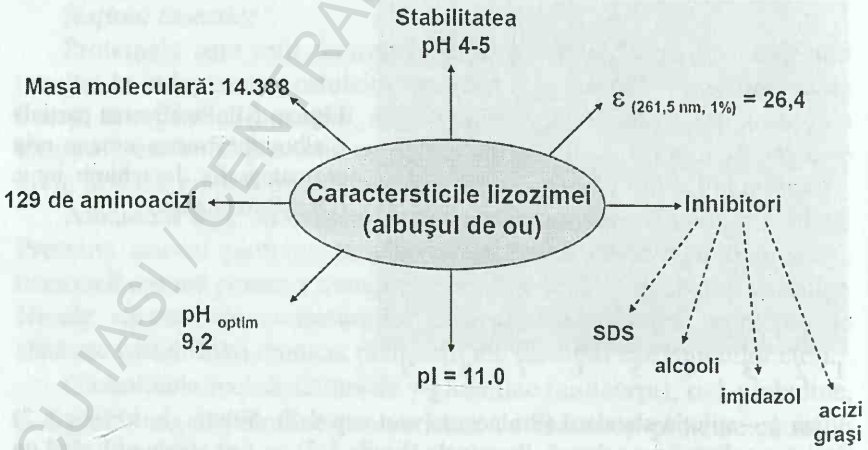
Linia 1 – soluție standard (Promega) (vezi cap 4-2). Soluția de ser (linia 2) înaintea aplicării pe coloană. Proteinele (liniile 3-7) au fost eluate utilizând un gradient de sare (0-350 mM NaCl). Fracțiunile rămase sunt rezultate la spălarea coloanei cu soluție tampon Tris 50 mM, 500 mM NaCl, pH 8,2.

foloseşte Metoda Bradford (90 µl reactiv Bradford şi 10 µl din fiecare fracţiune) în plăci prevăzute cu godeuri sau se măsoară absorbanţa fracţiunilor la 280 nm. Proteinele eluează în fracţiunile 20 – 50. S-a estimat o concentraţie de aproximativ 53% albumină în extractul iniţial, aplicat pe coloană (cantitatea de proteine din fracţiunile rezultate la separare se cuantifică utilizând metoda Bradford având drept standard γ-globulina).

Protocolul 2. Purificarea parţială a lizozimei şi testarea activităţii enzimatice

Noţiuni teoretice

Lizozima (muramidaza) este o enzimă din clasa hidrolazelor (familia glicozilaze) care scindează preferenţial (hidrolizează) legătura β-1,4-glicozidică dintre acidul N-acetil-muramic şi N-acetil-glucozamina, legătură care apare frecvent în pereţii celulari din diverse organisme. Lizozima este larg răspândită la animale sau plante. Această enzimă se localizează în secreţiile şi ţesuturile mamiferelor, salivă, lacrimi, lapte, leucocite, rinichi.



Schema 5.9. Proprietăţile lizozimei (enzimă din albuşul de ou)

Creşterea concentraţiei enzimei în ser sau urină poate fi asociată cu o formă de leucemie. Prezenţa lizozimei în lichidul cerebrospinal indică prezenţa unei tumori la nivelul sistemului nervos central. În mod normal lizozima este practic absentă în urină, bilă sau lichidul spinal. Enzima este frecvent utilizată pentru ruperea membranelor din *E. Coli* şi *Streptomycetes* în scopul extragerii proteinelor din aceste organisme.

Partea experimentală

Echipamente

- Agitator magnetic;
- pH-metru;
- Dispozitiv de separare FPLC.

Reactivi

- Soluţia 1: tampon de aşezare/spălare coloană: Tris 50 mM conţinând NaCl 50 mM pH 8.2;
- Soluţia 2: tampon de aşezare/spălare coloană: Tris 50 mM/NaCl 500 mM pH 8,2;
- un ou.

Modul de lucru

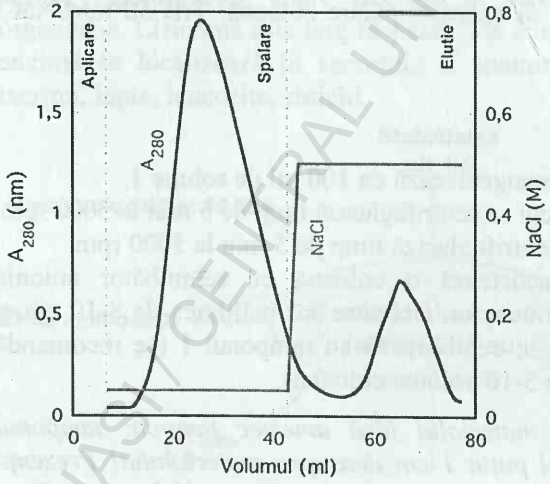
1. Albuşul unui ou se omogenizează cu 100 ml de soluţie 1.
2. După agitare amestecul se centrifughează timp de 5 min la 5000 rpm. Supernatantul se recentrifughează timp de 5 min la 5000 rpm.
3. În paralel se împachetează o coloană cu schimbător anionic suspendat în acelaşi tampon. Coloana (cu înălţimea de 8-10 cm şi diametrul de 1 cm) se echilibrează cu tamponul 1 (se recomandă spălarea cu cel puţin 5-10 volume coloană).

   Atenţie! Nu lăsaţi materialul fără amestec tampon; tamponul trebuie sa fie la cel puţin 1 cm deasupra materialului! Prezenţa bulelor de aer în coloana influenţează negativ profilul separării).

4. După echilibrarea coloanei cu acelaşi tampon se aplică 5 ml extract. Se colectează soluţia care trece prin coloană la aplicarea probei. Extractul rămas se păstrează la 4 °C.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. După aplicare se spală coloana cu 30 ml tampon pentru îndepărtarea proteinelor care se leagă nespecific de schimbătorul cationic. Lizozima este legată puternic de material.
6. Pentru eluție se folosește tamponul 2, o soluție cu un conținut ridicat de sare. În timpul eluției se folosesc tuburi de 1,5 ml numerotate în prealabil. Pentru urmărirea eluției se folosește metoda Bradford (90 µl reactiv Bradford și 10 µl din fiecare fracțiune) în plăci prevăzute cu godeuri.
7. Se cuantifică după separare lizozima din fracțiunile respective și se calculează concentrația totală a proteinelor din fracțiunile care conțin lizozima folosind o soluție standard de γ-globulină.
8. Se verifică enzima prin incubarea unui extract de *Ecoli* cu 20 µl de soluție care conține enzima de interes. Se determină concentrația proteinelor prin același procedeu înainte și după incubarea extractului cu lizozimă.



Schema 5.10. Profilul cromatografic obținut la separarea parțială a lizozimei prin cromatografie de schimb ionic

Probleme

1. Care este principiul care stă la baza separării proteinelor prin cromatografia de schimb ionic?
2. Prin ce metodă rapidă se pot identifica fracțiunile care au un conținut ridicat de proteine?

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Din ce motive celuloza este un suport cromatografic frecvent folosit la separarea proteinelor prin cromatografie de schimb ionic?
4. Un amestec de proteine conține: citocrom c (pI = 10,6); BSA (albumină serică bovină, pI = 4,9) și hemoglobină (pI = 6,8).
   a) Cum sunt încărcate aceste proteine la pH = 7,8? Care dintre proteine va fi reținută pe materialul cromatografic DEAE-Sephadex în aceleași condiții de pH?
   b) Cum sunt încărcate proteinele la pH = 5,5? Ce soluție tampon este adecvată pentru acest pH? Ce proteine vor fi reținute pe carboxi-metil-celuloză la această valoare a pH-ului? Cum sunt eluate aceste proteine?
5. După separarea proteinelor dintr-un extract biologic pe materialul cromatografic DEAE-Sephadex rezultă mai multe fracțiuni care conțin proteina de interes. Ce metodă poate fi folosită pentru stabilirea purității proteinelor dintr-o fracțiune dată? Prin ce metodă se pot concentra aceste fracțiuni?
6. Din ce motive în cromatografia de schimb ionic se folosește un gradient de sare pentru a eluа proteinele?
7. Care din următoarele răspunsuri este adevărat:
   a) cromatografia de schimb ionic este o metodă eficientă de separare a unei proteine, cu puritate mărită, dintr-un amestec de proteine;
   b) cromatografia de schimb ionic este o metodă intermediară de separare a unei proteine dintr-un amestec de proteine;
   c) cromatografia de schimb ionic este o metodă de extracție a unei proteine dintr-un amestec de proteine.

Bibliografie

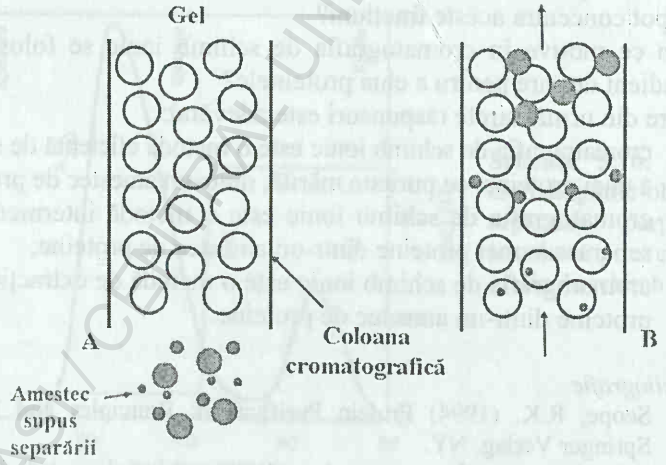
1. Scope, R.K. (1994) Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag, NY.
2. Ion exchange chromatography (1983). Principles and Methods, Pharmacia Biotech, S-75182, Uppsala, Sweden.
3. Schaller, J. et al. (2008), Human blood plasma proteins. Structure and function, Wiley, NY.
4. Deyl, Z. (1984) Separation Methods, Elsevier, Amsterdam, Netherland.
5. Kastner, M. (2000) Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library, vol 61, Elsevier, Amsterdam, Netherland.

6. Strang, R.H.C. (1984) Purification of egg-white lysozyme by ion exchange chromatography *Biochemical Education,* **12 (2)**, 57-59.
7. Millard, J. şi Fekele, B. (2009) Biochemistry of the Cell, BC 367, Laboratory, Experiment 3, Colby College, Waterville, USA.
8. http://www.egymedicine.net/forumsx/t17459.html

5.3. Cromatografia de excludere a masei moleculare

Acest tip de cromatografie se bazează pe diferenţele dintre masele moleculare ale macromoleculelor. Tehnica este frecvent folosită la separarea moleculelor cu mase moleculare cuprinse între sute şi milioane de unităţi atomice de masă (polizaharide, acizi nucleici, proteine, complexe enzimatice etc.).

Amestecul de macromolecule supus separării este aplicat în partea superioară a unei coloane conţinând particule poroase insolubile (Sephadex, Sepharose, Sephacryl, Superose, Superdex, Biogel P sau



Schema 5.11. Reprezentarea schematică a cromatografiei de excludere a maselor moleculare.

A. Material cromatografic înaintea aplicării amestecului supus separării;
B. Macromoleculele cu diametru mai mic pătrund în porii gelului, macromoleculele cu mase medii sau mari eluează invers proporţional cu masa moleculară a macromoleculelor.

A). Moleculele mai mici pot fi absorbite pe aceste particule (site moleculare pe bază de dextran, agaroză, poliacrilamidă), iar moleculele mari nu. În această manieră proteinele mai mari (proteinele care sunt prea largi pentru a intra în porii sitei) trec mult mai rapid (sunt eluate primele) prin coloană. Proteinele rămase sunt eluate în ordinea descrescătoare a masei lor moleculare. În funcție de gradul de reticulare al gelului separarea moleculelor poate fi diferită.

Dacă Sephadex G-25 (gel poros pe bază de dextran) poate permite excluderea sărurilor și a monozaharurilor (materialul este folosit în special la schimbarea soluției tampon în care se găsește proteina sau la desalinizarea probei rezultată după etapa de precipitare – moleculele de sare eluează în ultima etapă a separării) sau pentru separarea peptidelor și oligonucleotidelor, Sephadex G-200 este un gel mai puțin reticulat și permite separarea macromoleculelor într-un interval 5-200 kDa. În cele mai multe situații acest tip de cromatografie constituie ultima etapă cromatografică în decursul procesului de separare. Aceasta tehnică constituie o metodă importantă pentru estimarea masei moleculare relative a proteinelor sau altor macromolecule. În acest scop un amestec de proteine cu masă moleculară cunoscută este folosit pentru calibrarea coloanei înainte de estimarea masei moleculare necunoscute. Pentru proteinele cu forme similare, volumul de lichid eluat este proporțional cu logaritmul masei moleculare.

Separarea unor macromolecule prin cromatografie de excludere a masei moleculare

Prepararea gelului

În acest experiment materialul cromatografic folosit este Sephadex G-100. Acest material este utilizat la fracționarea macromoleculelor (în particular la separarea proteinelor) a căror masă moleculară variază între 4 și 150 KDa. Sephadex-ul G-100 este comercializat sub forma unei pulberi care trebuie hidratată timp de 2-3 zile la temperatura camerei (sau câteva ore pe o baie de apă). Materialul se expandează de circa 15-20 de ori. După procesul de expandare se decantează excesul de apă și se echilibrează materialul în soluția tampon. Se decantează tamponul și se resuspendă materialul în aceeași soluție tampon și se degazează.

Împachetarea coloanei

Se închide coloana la un capăt după care se adaugă suspensia uşor fără a crea porţiuni cu densităţi diferite. În situaţia în care sunt prezente straturi neuniforme sau bule de aer se inversează coloana şi se lasă materialul din nou să se reaşeze. Se conectează coloana la o pompă peristaltică şi se echilibrează coloana cu un volum de tampon mai mare decât volumul coloanei.

Tabelul 5.12. Tipuri de materiale utilizate la cromatografia de excludere a masei moleculare

Tipul gelului	Interval de separare (M, KDa)
Sephadex G-10	< 0.7
Sephadex G-25	1-5
Bio-Gel P-60	3-60
Sephadex G-75	3-70
Sephadex G-100	4-100
Bio-Gel P-100	5-100
Sephadex G-200	30-200
Sephacryl S-300	10-1.500
Sepharose 2B	70-40.000

Determinarea volumului porilor

Pentru determinarea volumului minim de soluţie tampon necesar pentru atingerea momentului eluţiei primei proteine se utilizează Blue Dextran, o polizaharidă a cărei masă moleculară este de cca 2 MDa. Polizaharidul se aplică la partea superioară a coloanei după care se măsoară volumul soluţiei tampon eluat din coloană până la dispariţia colorației albastre caracteristică polizaharidului. În situaţia în care împachetarea coloanei nu este corespunzătoare polizaharidul nu migrează sub forma unei benzi orizontale bine definite.

Separarea macromoleculelor

Amestecul supus analizei (hemoglobina, mioglobina, citocromul c şi vitamina B12) cu o concentraţie finală de 1 mg/ml se aplică la partea superioară a coloanei. Pentru o rezoluţie satisfăcătoare volumul aplicat

nu trebuie să depăşească 1-2% din volumul coloanei. Vitamina B12 având o masă moleculară redusă (1,35 KDa) este reţinută de porii materialului. Proteinele pot fi vizualizate datorită colorației lor caracteristice (nuanțe de roşu sau maro). Viteza de curgere a coloanei nu trebuie să depăşească 0,5 ml/min. În caz contrar materialul se poate comprima şi rezoluția scade. Se colectează fracțiuni a câte 1 ml a căror absorbanță poate fi citită la spectrofotometru la 280 nm. Se notează volumul de eluție pentru fiecare componentă. Se reprezintă grafic logaritmul masei moleculare în funcție de volumul de eluție. Se obține o dependență lineară. Puritatea fracțiunilor care conțin proteina poate fi verificată prin SDS-electroforeză.

Probleme

1. Separarea moleculelor în funcție de masa moleculară se face prin:
   a) Cromatografie de excludere a masei moleculare;
   b) Cromatografie de schimb ionic;
   c) Cromatografie de afinitate;
   d) Focusare izoelectrică;
   e) Difracție de raze X.
2. Care dintre proteine (cu masă moleculară mai mică sau mai mare) este eluată prima în cromatografia de excludere a masei moleculare?
3. Ce probleme pot apărea în situația în care materialul cromatografic este neuniform împachetat?
4. Ce proteine sunt folosite drept standard în cromatografia de excludere a masei moleculare?

Referințe

1. Fischer, L. (1980) Gel Filtration Chromatography, Elsevier, Amsterdam.
2. Porath, J. şi Flodin, P. (1959) Gel filtration: A method for desalting and group separation, *Nature*, **183**, 1657-1659.
3. Andrews, P. (1970) Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In Methods of Biochemical Analysis (Glikc, D., ed.), Vol. 18, pp.1-53, Interscience, New York.
4. Dubin, P.L. (1988) Aqueous Size-exclusion chromatography, Journal of Chromatography Library, vol. 40, Elsevier, Amsterdam.

5. Kar, A. (2005) Pharmaceutical drug analysis, New Age International (P) Ltd., New Delhi.
6. Kenney, A. şi Fowell, S. (1992) Practical Protein Chromatography, In Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
7. Roe, S. (2001) Protein Purification Techniques. A practical approach (Second Edition), Oxford University Press Inc., New York.

5.4. Cromatografia de afinitate

Cromatografia de afinitate se bazează pe afinitatea unor proteine pentru compuşi cu masă moleculară redusă. În practică, cromatografia de afinitate presupune fixarea covalentă a unor liganzi pe o matrice. Suportul cromatografic este utilizat la împachetarea unei coloane cromatografice pe care se aplică mai târziu un amestec care conţine un compus de interes. Numai macromoleculele care au afinitate pentru ligand (L) sunt reţinute în timpul mişcării lor pe coloană. După ce proteinele nespecifice părăsesc materialul, macromoleculele de interes sunt eluate prin disocierea complexului ligand-macromoleculă.

Cromatografia de afinitate poate fi folosită la izolarea şi purificarea unei palete largi de compuşi biologici. Această tehnică este utilizată pentru purificarea acizilor nucleici, enzimelor, proteinelor de transport, anticorpilor, proteinelor care sunt receptori pentru hormoni sau care prezintă afinitate pentru medicamente, proteine neurotransmiţătoare etc. De exemplu, concavalina A (o proteină din plante) poate fi purificată dintr-un extract utilizând un material care are glucoza covalent ataşată (proteina poate fi eluată de pe coloană cu o soluţie concentrată de glucoză), iar citidin deaminaza din celulele de *E. coli* poate fi izolată prin utilizarea citidinei fixate covalent pe agaroză.

Cromatografia de afinitate este utilizată şi în biologia moleculară, caz în care macromoleculele sunt fuzionate cu streptavidină (o proteină din bacteria *Streptomyces avidinii*), moleculă care are afinitate extrem de mare pentru biotină (vitamina B7).

Cromatografia de afinitate cu ioni imobilizaţi este o tehnică relativ nouă utilizată la purificarea proteinelor. Această tehnică se bazează pe formarea legăturilor coordinative dintre ionii metalici (Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+}) imobilizaţi pe o coloană (pe care este ataşat un braţ distanţator şi un ligand de chelatizare care leagă strâns ionii

metalici) şi resturile bazice din proteine (histidina). Purificarea proteinelor recombinante (gena care codează proteina de interes este clonată într-un vector de expresie care prezintă o secvență în care sunt codate 6-10 histidine) realizată pe Ni-NTA (acid nitriloacetic) are multe avantaje (timp scurt, puritate bună).

Separarea proteinelor His-tag prin cromatografie de afinitate

Această metodă constituie o metodă clasică de purificare a proteinelor. *His-tag* sunt secvențe care posedă 6-10 resturi consecutive de histidină la capătul C- sau N- terminal al proteinelor (alegerea capătului

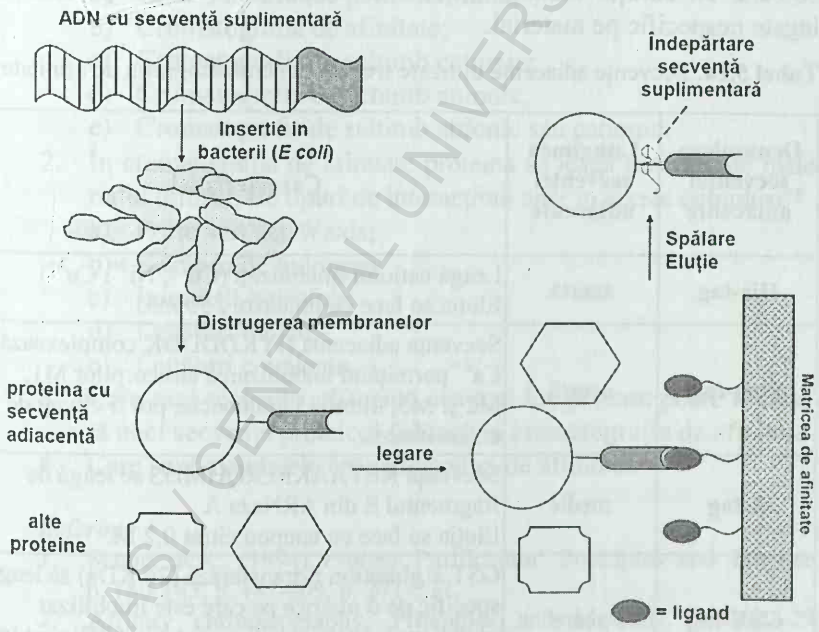


Figura 5.13. Reprezentarea schematică a purificării unei proteine recombinante ce posedă o secvență suplimentară ce poate prezenta afinitate pentru un anumit ligand

Adaptare după: Rehm, H. (2006), Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics (5 Auflage), Elsevier

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

corespunzător etichetării se face fără a modifica proprietățile proteinelor rezultate comparativ cu cele din natură). Proteinele care posedă segmente his-tag sunt produse în *E coli* sau sisteme de expresie din insecte.

Coloana conține agenți de chelatizare ai ionilor de nichel (Ni-NTA) grefați pe o matrice de agaroză. Pentru purificarea unei proteine solubile cu His-tag dintr-un amestec de proteine se echilibrează soluția respectivă (într-o soluție tampon ușor alcalină, 50 mM Tris, 20 mM imidazol, pH 8,0) cu gelul (Ni-NTA) timp de 1-24 h la 4 °C. Capacitatea de legare a gelului este de aproximativ 10-15 mg proteină cu His-tag la un ml gel. După absorbția proteinei pe coloană se spală coloana cu soluția tampon inițială în scopul îndepărtării proteinelor legate nespecific pe material.

Tabel 5.14. Secvențe adiacente utilizate frecvent în cromatografia de afinitate

Denumirea secvenței adiacente	Lungimea secvenței adiacente	Caracteristici
His-tag	scurtă	Leagă cationii imobilizați (Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}) Eluția se face cu imidazol 250 mM
Flag-tag	scurtă	Secvența adiacentă DYKDDDDK complexează Ca^{2+} permițând imobilizarea anticorpilor M1, M2 și M5; ultimii 5 aminoacizi pot fi clivați de enterokinază.
S-tag	medie	Secvența KETAAKFERQHMDS se leagă de fragmentul S din ARNaza A Eluția se face cu tampon citrat 0,2 M.
GST-tag	mare	GST = glutation S-transferaza (26 KDa) se leagă specific de o matrice pe care este imobilizat glutationul; proteinele fuzionate cu GST sunt în general stabile și solubile.

Pentru eluarea proteinelor se folosește o soluție tampon similară cu o concentrație de imidazol ridicată (50 mM Tris, 500 mM imidazol, pH 8,0). Prezența unei concentrații ridicate de imidazol în sistem determină

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

o competiție între secvența his-tag (aminoacidul histidină are în componență un nucleu imidazolic) și imidazol fapt care permite eluarea proteinei de interes din sistem. Prezența unei concentrații mari de imidazol în soluția ce conține proteina purificată nu este întotdeauna benefică. Îndepărtarea imidazolului se poate face utilizând o coloană G-25 (de excludere a masei moleculare).

Întrebări

1. Care dintre următoarele metode este adecvată pentru separarea unei proteine care se leagă puternic de substrat?
   a) Cromatografia de permeabilitate;
   b) Cromatografia de afinitate;
   c) Cromatografia de schimb cationic;
   d) Cromatografia de schimb anionic;
   e) Cromatografia de schimb anionic sau cationic.
2. În cromatografia de afinitate proteina se leagă puternic de materialul utilizat. Ce tipuri de interacțiuni apar în aceste complexe?
   a) Forțe van der Waals;
   b) Legături de hidrogen;
   c) Interacții hidrofobe;
   d) Legături ionice;
   e) Legături covalente.
3. Care este secvența adiacentă cea mai lungă (care poate fi atașată unei secvențe proteice) folosită în cromatografia de afinitate?
4. Care sunt avantajele cromatografiei de afinitate?

Referințe

1. Scope, R.K. (1994) Protein Purification: Principles and Practice, p. 180-183, p. 187-209, p. 271-277.
2. Affinity chromatography. Principles and Methods, 18-1022-29, Amersham Pharmacia Biotech.
3. The recombinant protein handbook. Protein amplification and simple purification, 18-1142-75, Amersham Pharmacia Biotech.
4. Antibody purification, 18-1037-46, Amersham Pharmacia Biotech.
5. Ausubel, F.M. și colab., Short protocols in molecular biology, 4th Edition, (Eds) p. 10(73)-10(81).

6. Affinity Chromatography: Methods and Protocols, Michael Zachariou (Ed) in Methods in Molecular Biology, **421**.
7. Wilchek, M. şi Miron, T. (1999) Thirty years of affinnity chromatography, *Reactive and Functional Polymers*, **41**, 263-268.
8. Terpe, K. (2003), Overview of tag protein fusion: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Appl Microbiol Biotechnol*, **60(5)**, 523-533.
9. Hage, D.S. şi Cazes. J. (2006) Handbook of Affinity Chromatography, (Second Edition, Chromatographic Science), CRC Press, Boca Raton, FL.

5.5. HPLC – Cromatografia de lichide de înaltă performanță

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (presiune) foloseşte drept fază staționară particule mici şi presiune mare pentru faza mobilă pentru a permite trecerea prin coloană (de obicei din oțel). Pe măsură ce analitul (soluția de separat sau analizat) trece prin coloană componenții săi interacționează mai slab sau mai puternic cu cele două faze (mobilă şi staționară). Componenții care interacționează mai puternic cu faza mobilă vor fi eluați primii din coloană. Interacțiunile repetate cu cele două faze permit separarea amestecului de analizat. Optimizarea separării probei se face prin schimbarea polarității fazei staționare sau mobile. Alegerea coloanei potrivite este esențială în obținerea unei separări optime. De asemenea, polaritatea fazei staționare poate fi aleasă în funcție de analitul separat. Faza staționară (alchil între 4 şi 18 atomi de carbon; amoniu-alchil) este în mod uzual legată de un suport solid (de exemplu particule poroase-geluri de silice sau polimeri organici). Mărimea porilor este definitorie în separarea cromatografică.

Tabel 5.14. Caracteristici ale cromatografiei de repartiție inversă sau normală

	Faza inversă	**Faza normală**
Faza staționară	Polaritate scăzută: silice grefată cu o catenă alchil sau fenil	Polaritate ridicată: $-C_2H_4CN$ $-C_3H_6NH_2$ $-C_3H_6N(CH_3)_2$

BCU IAŞI / CURRICULUM LIBRARY

	Faza inversă	Faza normală
Faza mobilă	Polaritate ridicată: -apă -metanol -CH_3CN -THF	Polaritate scăzută: -n-hexan -cloroform -eter etilic
Ordinea eluției	Compuși polari urmați de cei mai puțin polari	Compuși nepolari urmați de cei cu polaritate ridicată
Efectul creșterii polarității solventului	Scade timpul de retenție	Crește timpul de retenție

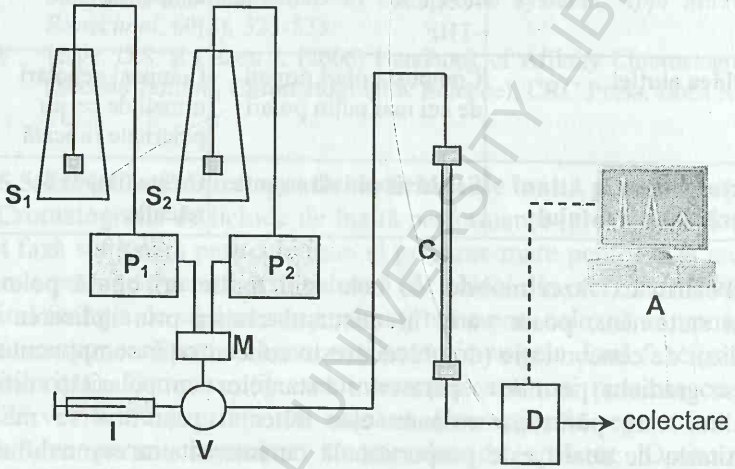
Polaritatea fazei mobile, de cele mai multe ori opusă polarității stării staționare, poate varia în decursul eluției prin aplicarea unui gradient de concentrație (de obicei crește concentrația componentei B). Acest gradient permite separarea substanțelor cu polarități diferite. Analitul care părăsește coloana este detectat prin diverse metode. Cantitatea de analit este proporțională cu intensitatea semnalului din detector. La o separare optimă fiecărui pic îi corespunde un compus. Prin măsurarea intensității semnalului și compararea răspunsului unei cantități cunoscute dintr-un anumit compus se poate calcula cantitatea de analit din amestec.

Un sistem HPLC constă din două rezervoare de solvent (soluție organică sau apoasă filtrată și degazată), cabluri de transfer prevăzute cu frite speciale, pompe de presiune ridicată, dispozitiv de amestecare a soluțiilor pompate, dispozitiv de injectare a probei, coloană, detector (spectrofotometru UV-VIS, refractometru, conductometru, amperometru sau fluorimetru) și calculator care controlează întregul sistem.

Aparatură și accesorii
Sistem de separare HPLC;
Coloană cromatografică.

Reactivi

- Soluții tampon filtrate printr-un filtru de 45 μm;
- Solvenți organici ultrapuri speciali pentru HPLC.



Schema 5.15. Diagrama simplificată a unui cromatograf de lichide:

S_1, S_2 – rezervoare cu solvent organic sau soluție tampon diluată;
P_1, P_2 – pompe care permit stabilirea unui gradient de concentrație;
M – manometru pentru măsurarea presiunii;
V– valvă prin intermediul căreia se face injectarea probei;
C – coloana cromatografică (analitică, semianalitică sau cantitativă);
D – detector (măsoară absorbanța la una sau mai multe lungimi de undă sau intensitatea fluorescenței);
A – sistem de achiziție a datelor (calculator + programe aferente).

Modul de lucru

1. Se prepară soluțiile tampon respectiv solvenții. Se filtrează soluțiile înainte de utilizare;

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Se umplu recipienții cu solventul adecvat și se îndepărtează bulele din soluție prin barbotare de heliu (10-15 min) sau prin degazarea conținutului pe o baie de ultrasunete (15-30 min);
3. Se verifică nivelul de solvent din fiecare recipient;
4. Se deschide sistemul de separare, de obicei în ordinea: calculator, pompa, sistem de degazare, detector (UV sau de fluorescență);
5. Se deschide pachetul software care permite controlul separării;
6. Se spală coloana pe rând (soluția B urmată de soluția A; ordinea trebuie respectată deoarece separarea începe cu soluția A) cu câte una din soluțiile degazate (5-10 min). Se urmărește presiunea celor două pompe;
7. Înainte de injectare, se filtrează proba de analizat printr-un fitru de 0,45 μm (pentru HPLC-ul analitic).

Atenție: proba de analizat trebuie să conțină o concentrație mică de sare! Desalinizarea probei se poate face utilizând o coloană de desalinizare, de exemplu, Sep-Pak C18, Millipore

Injectorul trebuie să fie în poziția „Load". Pentru injectare se folosește o seringă Hamilton, iar valva prin care se face injectarea trebuie să fie în poziția „Inject", și după aplicarea probei este repoziționată pe „Load";

8. Timpul de separare este de 30-50 min. În timpul separării se monitorizează presiunea din pompe;
9. După separare se injectează o altă probă (se repetă pașii 7-8);
10. La sfârșitul separării se spală sistemul cu apă bidistilată timp de 20 min, după care se spală sistemul cu MeOH 50% timp de 20 min și în final se clătește sistemul cu apă bidistilată;
11. Se deconectează coloana de la sistem și se închid capetele coloanei;
12. Se închide sistemul în ordinea detector, pompă, program.

Probleme

1. Care sunt metodele de detecție folosite în tehnica HPLC? Care dintre acestea se folosește la detecția peptidelor sau flavin adenin dinucleotidului (FAD-ului)?
2. În ce constă tehnica HPLC?

3. Poate fi utilizată tehnica HPLC pentru separarea şi identificarea unei proteine dintr-un extract de plante? Ce precauţii trebuie luate în această situaţie?
4. În compoziţia unei nonapeptide s-au identificat câte 2 resturi de lizină (Lys), glicină (Gly), respectiv fenil-alanină (Phe) şi câte un rest de histidină (His) metionină (Met) respectiv leucină (Leu). Peptida a fost incubată cu 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB) şi apoi hidrolizată, după care în urma analizei prin tehnica HPLC a fost identificată 2,4-dinitro-fenil-histidina. În situaţia în care aceeaşi peptidă a fost expusă la bromcian (CNBr) s-au obţinut o octapeptidă şi aminoacidul glicina. La incubarea peptidei native cu tripsina a rezultat o pentapeptidă, o tripeptidă şi aminoacidul lizină. După tratarea ultimelor peptide (pentapeptidei şi a tripeptidei) cu FDNB şi hidroliză au fost identificate 2,4-dinitro-fenil-histidina şi dinitro-fenil-fenilalanina. La incubarea peptidei iniţiale cu pepsina au rezultat o dipeptidă, o tripeptidă şi o tetrapeptidă (compusă din două resturi de lizină, fenilalanină şi glicină). Care din următoarele secvenţe este corectă:
   a) His-Leu-Gly-Lys-Lys-Phe-Phe-Gly-Met;
   b) His-Leu-Phe-Gly-Lys-Lys-Phe-Met-Gly;
   c) Gly-Phe-Lys-Lys-Gly-Leu-Met-Phe-His;
   d) Met-Leu-Phe-Lys-Phe-Gly-Gly-Lys-His;
   e) His-Phe-Leu-Gly-Lys-Lys-Phe-Met-Gly.

Bibliografie

1. McMaster, M.C. (2007) HPLC, a practical user's guide (2nd Edition), Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
2. Fallon, A., Brooth, R.F.G. şi Bell, L.D. (1987) Applications of HPLC in biochemistry In Laboratoty Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 17, Elsevier, Amsterdam.
3. Hearn, M.T. (1982) High-performance liquid cromatography and its application to protein chemistry, *Adv Chromatogr.*, **20**, 1-82.
4. Bidlingmeyer, B.A. (1991) Preparative liquid chromatography. In Journal of chromatography library, vol. 38, J Wiley & Sons, NY.
5. Snyder, L.R., Glajch, J.L., şi Kirkland, J.J. (1988) Practical HPLC Method Development, Wiley & Sons, New York.

6. Oliver, R.W.A. (1998) HPLC of Macromolecules: A Practical Approach, (2nd Ed), Oxford University Press.
7. Aguilar, M.-I. (2004) HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols, In Methods in Molecular Biology, vol. 251, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
8. Hanai, T. (1999) HPLC A Practical Guide, The Royal Society of Chemistry, UK.
9. Millner, P.A. (1999) High Resolution Chromatography: A practical approach, in The Practical Approach Series, Hames, B.D. (Ed.), Oxford University Press, New York.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 6

Măsurarea activității enzimatice

6.1. Determinarea activității enzimatice a unor enzime din diverse surse

6.1.1. Determinarea activității catalitice a peroxidazei din hrean

Peroxidaza din hrean este o enzimă (o glicoproteină) cu masa moleculară de 44 KDa şi care posedă protohemină IX drept grupare prostetică. Pentru o activitate catalitică corespunzătoare hemul este indispensabil.

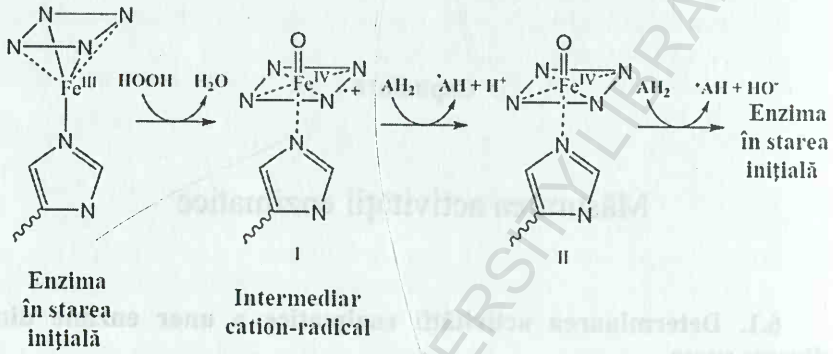
Mecanismul de reacție al peroxidazelor este descris în Schema 6.1. Enzima reacționează cu un echivalent de apă oxigenată, reacție în urma căreia rezultă un cation-radical, în care atomul de fier îşi schimbă starea de oxidare (de la III la IV). Această reacție de oxido-reducere implică cedarea a doi electroni. Un echivalent rezultă de la ionul Fe^{III}, dând naştere la intermediarul oxiferil (Fe^{IV}=O). Acest intermediar, I, oxidează un substrat organic (AH_2) la radicalul corespunzător (·AH). Compusul rezultat suferă din nou o reacție de oxidare (cel de-al doilea electron este cedat) conducând la intermediarul II, în care centrul oxiferil este coordinat de ligandul porfirinic normal (dianionic). În final, compusul II, este redus la starea nativă (ferică) concomitent cu oxidarea substratului.

Funcția peroxidazei este de a converti apa oxigenată, compus care poate produce unele reacții metabolice nedorite, în apă şi oxigen:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidaza}} 2H_2O + O_2$$

BCU "ASE" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Oxigenul poate adesea reacționa cu alți compuși din celulă pentru a produce compuși secundari.



Schema 6.1. Mecanismul de acțiune al peroxidazelor în forma simplificată

Reacția catalizată de peroxidază poate fi măsurată prin urmărirea formării oxigenului rezultat prin două variante:

a. acumularea gazului într-un sistem închis și măsurarea acestuia cu ajutorul unui nanometru;

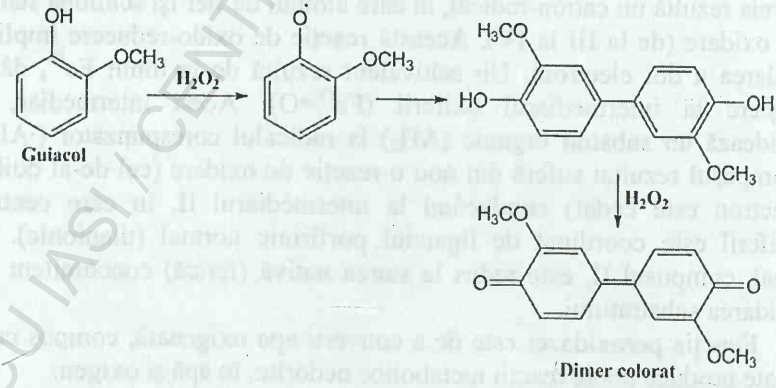


Figura 6.2. Determinarea enzimatică a peroxidazei prin intermediul oxidării guiacolului la un dimer colorat

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR

b. prin apariția unei forme „active" a oxigenului. O serie de compuși reacționează cu oxigenul și sunt transformați în compuși colorați. Drept donor de hidrogen se pot utiliza 5-amino-1,4-ftalazin-diona (luminol), 3-amino-9-etilcarbazolul (AEC), acid 5-amino-salicilic (5AS), 4-cloro-1-naftolul (4C1N), 3,3'-diamino-benzidina (DAB), o-dianisidina, guiacolul, o-fenilendiamina (OFD), acid ascorbic, rezorcina, pirogalol.

Peroxidaza este o enzimă ideală pentru experimente, deoarece este ușor de izolat din diferite surse (bacterii, vegetale, ciuperci sau animale).

Aplicații

Peroxidaza a fost folosită cu succes în imunologie prin legarea acestei enzime de anticorpi în scopul localizării antigenilor.

Reactivi și materiale

1) Soluție stoc de apă oxigenată 10 mM (în tampon fosfat 100 mM pH 7);
2) Soluție tampon 100 mM (fosfat pH 6);
3) Soluție o-dianisidină 30 mM (10 mg într-un ml metanol);
4) Soluție tampon de reacție: 9,6 ml soluție tampon + 0,1 ml o-dianisidină 30 mM.

Modul de lucru

Într-o cuvă din plastic se pipetează 0,97 ml soluție tampon de reacție și 20 µl enzimă. Se omogenizează conținutul după care se adaugă 10 µl de apă oxigenată. Se înregistrează absorbanța la 436 nm și 25 °C. Se măsoară viteza de reacție utilizând un coeficient de extincție $\varepsilon_{436} = 8300\ M^{-1}cm^{-1}$.

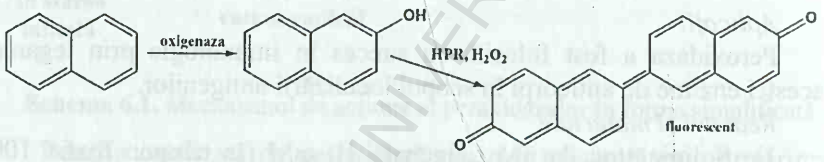
Se determină viteza de reacție menținând constantă concentrația enzimei și temperatura de reacție variind concentrația apei oxigenate.

Se va măsura viteza de reacție la 15, 25, 37 °C folosind condițiile inițiale de reacție.

Toate măsurătorile vor fi repetate de cel puțin 3 ori. Se vor determina următorii parametri: Vmax, Km și Ea.

Determinarea activității peroxidazei cu ajutorul fluorescenței

Sistemul peroxidaza/H_2O_2 a fost utilizat cu succes pentru detecția produșilor de reacție rezultați în urma reacțiilor catalizate de oxigenaze (P450). În prima fază substratul este un compus aromatic, de exemplu naftalina, care poate fi convertită la compuși aromatici hidroxilați. Compușii rezultați (de exemplu, α- sau β-naftolul) pot fi convertiți în urma reacției de oxidare de la un compus incolor la un substrat fluorescent. Compușii aromatici hidroxilați formează dimeri sau polimeri, care în funcție de condiții pot fi detectați prin colorimetrie sau fluorescență, permițând determinarea compusului inițial.



Schema 6.3. Detecția monooxigenazelor prin intermediul unei reacții enzimatice cuplate în urma căreia rezultă un produs fluorescent

Pe aceeași reacție se bazează și detecția bacteriilor ce produc peroxidaza în medii lichide sau solide prin adăugarea apei oxigenate. Mutanții care dau reacție pozitivă se disting prin proprietăți colorimetrice sau fluorescente.

Reactivi

Soluție tampon: PBS pH 7,4 (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,24 g KH_2PO_4 la 1 litru soluție);

Soluție 1: 0,01 M α-naftol în metanol;

Soluție 2 (se prepară proaspătă): soluție diluată de peroxidaza din hrean;

Apă oxigenată 30%.

Modul de lucru

La 975 µl soluție tampon se adaugă 10 µl soluție 1. Se adaugă 5 µl apă oxigenată 30%, 10 µl soluție 2. Rezultă produși de reacție care prezintă fluorescență albastră. Fluorescența relativă a produșilor de

reacție se măsoară după 1, 5 și 10 min. Se repetă măsurătorile utilizând diverse concentrații de α-naftol menținând constanți ceilalți parametri. Toate măsurătorile se execută în triplicat.

Întrebări

1. Ce ioni metalici se găsesc în structura peroxidazelor?
2. Care sunt sursele vegetale ce conțin o cantitate mare de peroxidază?
3. Care este maximul de emisie al compusului fluorescent rezultat în urma conversiei naftolului asistată de peroxidază?
4. Poate fi folosită peroxidaza la determinarea concentrației apei oxigenate?

Bibliografie

1. Tauber, H. și Petit, E.L. (1952) Convenient methods for preparing crystalline catalase from cow liver, *JBC,* **195**, 703.
2. Bisswanger, H. (2004) Practical Enzymology, Wiley-VCH GmbH, Weinhein.
3. Torres, E. și Ayala, M. (2010) Biocatalysis based on heme peroxidises: Peroxidases as potential industrial biocatalysts, Springer-Verlag, Berlin.
4. Moller, K. M. și Ottolenghi, P. (1966) The oxidation of o-dianisidine by H_2O_2 and peroxidase at neutral pH. *C.R Trav Lab Carlsberg*, **35(16)**, 369-389.
5. Claiborne, A. și Fridovich, I. (1979) Chemical and enzymic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. 2. Evidence for a substrate radical-enzyme complex and its reaction with nucleophiles, *Biochemistry*, **18 (11)**, 2329-2335.
6. Hamilton, T.M., Dobie-Galuska, A.A. și Weintstock, S.M. (1999) The o-phenylenediamine-horseradish peroxidise system: enzyme kinetics in the general chemistry laboratory, *J Chem Edu.*, **76(5)**, 642.
7. Joo H., Arisawa, A., Lin, Z. și Arnold, F.H. (1999), A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases, *Chem. Biol.*, **6**, 699-706.
8. http://www.worthington-biochem.com/hpo/default.html

6.1.2. Determinarea activității catalazei. Influența pH-ului, temperaturii și a tăriei ionice asupra vitezei de reacție

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este un agent oxidant nociv, produs de corpul uman în urma oxidării acizilor grași sau în cazul în care celulele albe sangvine atacă bacteriile care pot avea efecte negative asupra metabolismului celular. Catalaza este prezentă într-o varietate de surse: plante (fructe), carne sau ficat. De asemenea catalaza poate fi utilizată la identificarea bacteriilor. Dat fiind faptul că această enzimă nu este prezentă în streptococi, dar este prezentă în stafilococi, această enzimă poate fi utilizată la diferențierea dintre aceste specii. Catalaza se află în concentrație foarte mare în organitele celulare (ale plantelor sau animalelor) numite peroxizomi și protejează astfel celula față de peroxidul de hidrogen, compus care poate fi convertit în radicali hidroxil și implicit să creeze mutații genetice. Catalaza utilizează de asemenea apa oxigenată în scopul de a oxida o serie de compuși toxici, incluzând fenoli, acidul formic, formaldehida sau alcoolii.

Măsurarea vitezei reacției enzimatice se poate face direct (cu ajutorul unui electrod de oxigen) sau indirect. În acest experiment, viteza de reacție este măsurată indirect. Pentru determinarea vitezei de reacție se utilizează o hârtie de filtru care este acoperită cu enzima și apoi imersată într-o soluție de substrat (apă oxigenată). Enzima (catalizatorul biochimic) mărește viteza de descompunere a apei oxigenate în apă și oxigen, iar moleculele de gaz formate constituie forța motrice de deplasare a hârtiei de filtru de la baza tubului la suprafață. Timpul necesar hârtiei de filtru pentru a parcurge această distanță (de la bază la suprafață) este un indicator al vitezei reacției enzimatice.

Viteza de reacție = Înălțimea lichidului din vas (mm) / timp (s)

Aparatura și materialele necesare:

- aparat cu ultrasunete;
- pH-metru;
- tuburi din plastic cilindrice;
- pensetă;
- cronometru de laborator;
- un cartof, măr sau de preferat cantitate mică de ficat;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- pâlnie şi hârtie de filtru;
- centrifugă.

Reactivi:

- acetat de sodiu 20 mM pH=5
- fosfat de sodiu 20 mM pH=7
- borat de sodiu 20 mM pH=9
- glicină 20 mM pH=11

Atenţie catalaza este stabilă la temperatura redusă (după obţinere extractul se păstrează pe gheaţă) şi la pH 7!

Modul de lucru

Într-un pahar Berzelius sau un tub de plastic de 50 ml se cântăresc 2 g de ficat. Se taie mărunt ficatul şi se resuspendă în 10 ml soluţie tampon fosfat 20 mM pH 7. Se păstrează amestecul omogen pe gheaţă şi se supune ultrasonicării timp de 30 de secunde. Se repetă procedeul de 3-5 ori cu pauze de un minut. După sonicare se pipetează câte 1 ml în două tuburi Eppendorf şi se centrifughează amestecul 5 min la 10000 rotaţii pe minut (rpm). Se pipetează supernatantul (partea superioară din tub) şi se foloseşte extractul (*se păstrează pe gheaţă!*) pentru experimentele ulterioare.

Diluţia enzimei se va face în trei serii (1:100, 1:200, 1:500). Se va măsura viteza reacţiei enzimatice pentru fiecare diluţie. Cu ajutorul unui perforator se obţin rondele de hârtie de filtru. Se va imersa una dintre rondele în soluţia care conţine enzima diluată. În paralel se prepară într-un tub soluţia cu apă oxigenată 1% în tamponul pH 7 (înălţimea soluţiei va fi de 40 mm). Se imersează hârtia de filtru, care a fost îmbibată în soluţia enzimei, în tubul cu substrat (apa oxigenată) şi se măsoară timpul parcurs de rondeaua de hârtie de la bază până la suprafaţa lichidului. Se repetă fiecare determinare de 5 ori.

O soluţie de catalază (100 µl) se încălzeşte la fierbere 10 min. În paralel se incubează la temperatura camerei o soluţie cu acelaşi volum. Se repetă experimentul de mai sus utilizând o soluţie diluată (1:100) şi se compară viteza de reacţie obţinută în cele trei experimente.

Se efectuează determinările de activitate folosind o diluție 1:500 pentru enzimă și concentrații diferite pentru apă oxigenată (0,5; 1 respectiv 2%). Se notează timpul de reacție.

Se efectuează determinările de activitate folosind o diluție 1:500 pentru enzimă și valori diferite de pH (5, 7, 9, 11). Se reprezintă grafic viteza de reacție în funcție de pH.

Se efectuează determinări de activitate folosind o diluție 1:200, 1% apă oxigenată și concentrații diferite de clorură de sodiu (0, 2, 10% NaCl în aceeași soluție tampon). Se reprezintă grafic viteza de reacție în funcție de concentrația de NaCl (tăria ionică a soluției).

Opțional se poate compara viteza reacției (la pH 7 și diluție 1:100) catalizată de enzima extrasă din diverse surse: drojdie uscată, cartof, ficat. Procedeul de extracție din toate sursele va fi identic.

Întrebări:

a) Care este rolul catalazei în organism?
b) Ce efect are temperatura asupra activității enzimatice?
c) Cum variază viteza reacției enzimatice în funcție de diluție?
d) Cum variază viteza de reacție în funcție de concentrația substratului?
e) Ce efect are pH-ul asupra activității enzimatice?
f) Ce efect are concentrația sării asupra activității enzimatice?

Bibliografie:

1. Forbes, B.A., Sahm, D.F. și Weissfeld, A.S. (2007) Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology (Editia a 12-a), Weissfeld.
2. Cojocaru, D.C. (2009) Enzimologie practică, Editura Tehnopress, Iași.
3. Dogan, T. (2008) The effects of hydrogen peroxide, gallic acid and resveratrol on growth and catalase production of *Aspergillus fumigatus*, Master thesis, Middle East Technical University.
4. Eisenthal, R. și Danson, M.J. (2002) Enzyme assays: a practical approach (2nd ed), Oxford University Press Inc., New York, US.
5. Goldberg, D.T. (2007) Barron's AP Biology. (2nd ed), New York, NY:Barron's Educational series.
6. Cordts, M., Ridenour, N. și Hickey, M.K. (2008) The Properties of Enzymes: A study of catalase, Cornell University.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/catalase_lab.html
8. http://www.horton.ednet.ns.ca/staff/jfuller/selig/labs/bio12ap_adv/Catalase_paperdiscs.pdf.
9. http://www.explorebiology.com/documents/03LabEnzymeCatalysis2004.pdf
10. http://www.biologyjunction.com/ap_sample_lab_2_catalysis_2.htm

6.1.3. Caracterizarea polifenoloxidazei din banane

Polifenoloxidazele sunt enzime responsabile pentru modificarea enzimatică a culorii (închiderea culorii) fructelor şi vegetalelor care sunt distruse / porţionate. Polifenoloxidaza din banană catalizează oxidarea diverşilor orto-difenoli la chinonele corespunzătoare. Chinonele reactive formează la rândul lor în urma unor reacţii neenzimatice pigmenţii numiţi melanine. Melaninele care apar în plante sunt rezultatul condensării o-chinonelor cu aminoacizi, peptide sau proteine.

Partea experimentală

Extracţia enzimei

Enzima activă poate fi extrasă din pulpa bananei cu ajutorul unui tampon care conţine un agent care are rolul de a proteja enzima de precipitare în prezenţa taninurilor.

Toate operaţiile se desfăşoară pe gheaţă!

4 g de fruct (banană) se taie cu ajutorul unui cuţit în bucăţi de dimensiuni reduse şi se introduc în 36 ml de tampon (fosfat 0,1 M pH 7; răcit în prealabil pe gheaţă) care conţine 1% Triton X-100 (detergent neionic). Omogenizarea se realizează cu ajutorul unui aparat de ultrasunete (3 ori, 2 min, amplitudinea 50%, 1 s sonicare, 1 s pauză), după care se centrifughează timp de 10 min la 5000 rpm. Supernatantul se foloseşte pentru determinarea activităţii enzimatice ulterioare.

Determinarea activităţii enzimatice

Activitatea enzimei se poate determina prin măsurarea producerii chinonelor corespunzătoare. Astfel, dacă pentru dopamină (10 mM) se urmăreşte formarea 2,3-dihidroindol-5,6-chinonei, un produs de culoare roşie (470 nm), pentru orto-difenol (10 mM) nesubstituit activitatea se măsoară la 412 nm (coloraţie galbenă-portocalie). Activitatea catalitică se înregistrează timp de 2-3 min la 25 °C. În general, diluţia enzimei este de 1:20. În cazul măsurătorilor de activitate este necesară

verificarea autooxidării substratului. O unitate de activitate a polifenol oxidazei (PFO) este definită drept cantitatea de enzimă ce catalizează transformarea unui μmol de substrat/min în condițiile de reacție. Dacă se măsoară activitatea specifică (unități/mg proteină) este necesară măsurarea concentrației totale a proteinei utilizând drept standard albumina serică.

Inactivarea termică și pH-ul optim al enzimei

Soluțiile de enzimă sunt incubate la temperaturi de 40-95 °C timp de 15 min, după care activitatea este măsurată la 25 °C. PFO are un pH optim de 7,0 în situația în care substratul este dopamina.

Inhibiția PFO din banană asemeni altor fenolaze este o metaloenzima care conține ioni de cupru. Astfel, agenții de chelatizare (feniltiouree sau cuprizona) pot inhiba activitatea enzimatică la concentrații de 10^{-3}-10^{-5} M. De asemenea, PFO poate fi inhibată de ionul CN^- sau de produșii rezultați în urma reacției enzimatice.

Întrebări:

1. Din ce motiv se schimbă culoarea unor fructe (pere, banane etc.) la secționarea acestora? Cum poate fi prevenit acest fenomen?
2. La ce temperatură enzima PFO devine inactivă? Cum se modifică activitatea extractului dacă se încălzește într-un cuptor cu microunde pentru 30, 60 sau 120 secunde?
3. Ce se întâmplă cu activitatea PFO în prezența clorurii mercurice (*Atenție compus foarte toxic!)* sau a acidului acorbic?

Bibliografie

1. Eskin, N.A.M. et al. (1971), *Biochemistry of Foods,* Academic Press, 1971, p. 83.
2. Palmer, J.K. (1963), Banana polyphenoloxidase. Purification and properties, *Plant Physiol.,* **38 (5)**, 508-513.
3. Brown, F.C. și Ward, D.N. (1957) Study on mammalian tyrosinase, *JBC*, **223**, 77-80.
4. Gregory, R.P.F. și Bendall, D.S. (1966) The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.), *Biochem. J.*, **101**, 569-581.

5. Brown, C.R. (1983) Banana polyphenol oxidase, *School Science Review*, **64**, 690-697.
6. Duckworth, H.W. şi Coleman, J.E. (1966): Physiological and Kinetic Properties of the Polyphenol Oxidase of Mushroom Tyrosinase, *JBC*, **241**, 5307.
7. Patil, S.S. şi Zucker, M. (1965) Potato phenolases. Purification and properties, *JBC*, **240**, 3938-3943.
8. Mayer, A. M. şi Harel, E. (1979) Polyphenol oxidases in plants, *Phytochemistry*, **18**, 193-215.
9. Pomerantz, S.H. (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinase from hamster melanoma, *JBC*, **238**, 2351-2357.
10. Palmer, J.K. şi Roberts, J.B. (1967), Inhibition of banana polyphelofoxidase by 2-mercaptobenzothiazole, *Science*, **157 (758)**, 200-201.
11. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. şi Krebs, B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containg a dicopper center, *Nat. Str. Biol*, **5(12)**, 1084-1090.

6.1.4. Determinarea activităţii β-amilazei

β-Amilaza sau *α-1,4-D-glucan-maltohidrolaza* clivează legăturile α-1,4-glicozidice (îndepărtând resturile de maltoză) de la capetele nereducătoare ale substratului polizaharidic. Dat fiind faptul că nu clivează legăturile α-1,6-glicozidice (din glicogen sau amilopectină) hidroliza este incompletă rezultând de asemenea dextrine.

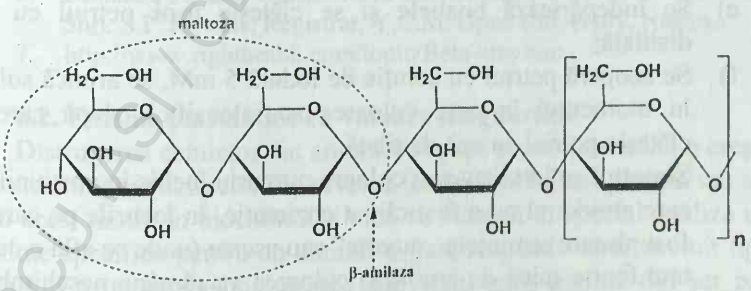


Diagrama 6.4. Modul de clivare al β-amilazei

Amilaza este frecvent întâlnită în țesutul plantelor, dar mai ales în semințele încolțite, unde funcția sa este aceea de a iniția clivarea amidonului în glucoza, compus care este necesar în procesul de germinație. β-Amilaza se întâlnește și la bacterii sau drojdii și din acest motiv este utilizată în scopuri industriale în procesele de fermentație al berii. De asemenea, amilaza este folosită în industria textilă sau a detergenților (în balsamul de rufe).

Materiale

- Petriuri din plastic conținând amidon-agar (0,2% amidon solubil, 2% agar);
- Autoclavă pentru sterilizare;
- Marker colorat rezistent la apă.

Reactivi

- 5 mM KI/I_2 în apă (Soluția trebuie să fie portocalie!);
- Apă distilată.

Modul de lucru

a) Se sterilizează petriurile cu mediu solid;
b) Se notează petriurile astfel: „semințe încolțite", „semințe fierte", „semințe uscate", „salivă"(conține α-amilaza);
c) Cu ajutorul unui lame se taie boabele longitudinal și se plasează cu partea secționată pe mediul solid (distanța dintre boabe trebuie sa fie de cel puțin 2-3 cm);
d) Se incubează timp de 30 min;
e) Se îndepărtează boabele și se clătește ușor petriul cu apă distilată;
f) Se acoperă petriul cu soluție de iodură 5 mM, se aruncă soluția în momentul în care culoarea se intensifică, după care se clătește petriul cu apă distilată.

Suportul solid va avea o culoare purpuriu închis în porțiunile în care amidonul nu a fost clivat enzimatic. În locurile pe care au fost plasate semințele „moarte" sau uscate (unde se află o cantitate foarte mică de amilază) culoarea va rămâne neschimbată. Porțiunile pe care s-au pus picături de salivă sau „semințe

încolțite" vor fi transparente deoarece amidonul este convertit în maltoză (dizaharid care nu dă reacție de culoare cu iodura).

Întrebări:

1) Unde a fost degradat amidonul?
2) Ce indică decolorarea zonelor purpurii?
3) Ce tip de amilază se află în saliva umană?

Bibliografie

1. Thoma, J.A. şi Koshland, D.E. (1960) Stereochemistry of enzyme, substrate and products during β-amilase action, *JBC,* **235**, 2511-2517.
2. Wang, S.-M., Wu, S.-Y. şi Chen, J. (1992) Purification and characterization of beta-amylase in maize kernel, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **33**, 359-367.
3. Hong, M.M. (1998) The discovery of amylase In Discoveries in Plant Biology, vol I, Kung, S.-D., Yang, S.-F. (Eds), Word Scientific Publishing, Singapore.
4. Laloknam, S. et al. (2009) Study of detection of amylase activity from vegetables and fruits in an undergraduate classroom, *International conference on the role of Universities in hands-on education Rajamangala University of Tehnology Lanna,* Chiang-Mai, Thailland, 23-29 August.
5. Gamper, H.A. şi Boller, T. (2010) Praktikum in Pflanzenphysiologie und wurzelsymbiotischer Ökophysiologie, Botanisches Institut der Universitat Basel, Basel, Switzerland.
6. Domade, P., Lab Workbook in Lab Course M. Sc. (Bio-Technology) Shri. S.P. Kowale, Registrar, Y.C.M. Open University, Nashik.
7. http://www.righthealth.com/topic/Beta-amylase

6.2. Enzime plasmatice cu valoare diagnostică

Distrugerea celulelor din anumite organe poate determina o creştere a concentrației enzimelor din diverse lichide biologice (plasmă sau ser). Din acest motiv în biochimia clinică se vizează în special analiza unor enzime specifice pentru un anumit organ, respectiv unui anumit tip de celulă. Creşterea sau micşorarea activității unei enzime din ser poate indica o anumită afecțiune. De exemplu valori mari ale activității alanin- şi aspartat-aminotransferazelor sunt înregistrate în cazul hepati-

telor virale, unde hepatocitele sunt afectate. O reducere a activității unor enzime plasmatice poate fi consecința unor modificări metabolice. Colinesteraza este o enzimă plasmatică, produsă de celulele ficatului. În cazul hepatitelor activitatea colinesterazei este redusă fapt care indică îmbolnăvirea celulelor hepatice.

Pentru scopurile diagnostice se recomandă cuantificarea acelor enzime care au o concentrație mai mare în celulă, specificitate pentru anumite organe și a căror determinări de activitate sunt ușor de efectuat.

Tabelul 6.5. Enzime indicator și specificitatea lor pentru diverse organe

Organul/celula	Enzima	Specificitatea
Căile biliare	Leucin-amino-peptidaza	+++
	γ-Glutamil-transpeptidaza	+++
	5'-nucleotidaza	+++
	Fosfataza alcalină	++
	Ceruloplasmina	++
Eritrocitele	Fosfataza acidă totală	++
	Lactat dehidrogenaza totală	+
	Glutamat-oxalacetat-transaminaza	+
Ficatul	Ornitin-carbamil-transferaza	+++
	Colinesteraza	+++
	γ-Glutamil-transpeptidaza	+++
	Glutamat-piruvat-transaminaza	++
	Glutamat-oxalacetat-transaminaza	+
	Lactat dehidrogenaza totală	+
	Aldolaza	+
Glandele salivare	Amilaza	++
Mușchiul cardiac	2-Hidroxi-butiril dehidrogenaza	++
	Creatin kinaza	++
	Lactat dehidrogenaza totală	+
	Glutamat-oxalacetat-transaminaze	+
Mușchii scheletici	Creatin kinaza	++
	Aldolaza	+
	Lactat dehidrogenaza totală	+
	Glutamat-oxalacetat-transaminaze	+
	Glutamat-piruvat-transaminaza	+
Oasele	Fosfataza alcalină	++

BCU IASI CENTRU UNIVERSITAR

Organul/celula	Enzima	Specificitatea
Pancreasul	Lipaza	+++
	Amilaza	++
	Glutamat-oxalat-trasaminaza	+
	Leucin-amino-peptidaza	+
Prostata	Fosfataza acidă	+++
Stomacul	Pepsinogen	+++

Klinische Chemie. Richterich, R. şi Colombo, J. P. (1978)

Pentru fiecare organ trebuie cunoscut acel set de enzime caracteristice, întrucât unele dintre acestea nu au specificitate absolută pentru un anumit organ. În tabelul 6.5. sunt prezentate diverse enzime şi specificitatea lor pentru diverse organe.

În majoritatea cazurilor în ser apar mai multe enzime, izoenzimele, care au aceeaşi activitate catalitică, dar secvenţa diferită (deoarece sunt codate de gene diferite). Cel mai adesea organe diferite sintetizează diferite izoenzime: în inimă se află preponderent o izoenzimă CKMB (a creatinin kinazei), pe când o altă formă (izoformă, CKMM) este localizată îndeosebi în muşchi. Din acest motiv determinarea izoenzimelor joacă un rol deosebit în diagnoză, permiţând identificarea organului bolnav. În clinică, determinarea izoenzimelor creatin kinazei şi lactat dehidrogenazei este un indicator al bolilor de inimă sau muşchi, în timp ce fosfataza alcalină este un indicator al bolilor ficatului, căilor biliare, oaselor sau în depistarea tumorilor.

6.2.1. Măsurarea activităţii enzimatice: consideraţii generale

Pentru măsurarea activităţii enzimatice a unor enzime din ser trebuie să avem în vedere reacţia chimică mediată de aceste proteine. Viteza de reacţie este o măsură a reacţiei enzimatice. Pentru fiecare test enzimatic este necesar un control riguros al unor anumiţi parametri (pH, temperatură, prezenţa unor ioni metalici – Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} sau a unor compuşi tiolici respectiv a unei concentraţii optime de substrat), care sunt specifici pentru fiecare enzimă. Majoritatea testelor enzimatice se efectuează la concentraţii ale substratului care să permită "saturarea" enzimei. Viteza maximă v_{max} este o măsură a cantităţii de enzimă. Unitatea de măsură pentru activitatea enzimatică este U. 1U este

cantitatea de enzimă care în condiții optime experimentale transformă un mol de substrat pe minut. Pentru ser activitatea enzimatică este exprimată în U/l.

O altă unitate de măsură folosită pentru cuantificarea activității enzimatice este katalul. 1 Katal reprezintă activitatea catalitică echivalentă cu transformarea unui mol de substrat pe secundă.

$$1\ U/l = 16.67\ nKat/l \qquad (nKat = 10^{-9}\ mol/s)$$

Determinarea activității catalitice se face cu ajutorul unui test optic. Modificarea concentrației substratului în decursul reacției enzimatice poate fi determinată pe baza modificării absorbanței. Prin intermediul legii Lambert-Beer poate fi calculată concentrația:

$$c = \frac{A}{l \cdot \varepsilon}$$

unde: A – absorbanța;
ε – coeficient molar de absorbție;
l – lungimea cuvei;
c – concentrația probei.

$$\text{Activitatea enzimatică} = \frac{\text{modificări}}{\text{timp}} = \frac{\Delta c}{\text{min}} = \frac{\Delta A}{\text{min} \cdot l \cdot \varepsilon}$$

În diagnosticarea clinică activitatea enzimatică din ser se exprimă în U/l și se calculează astfel:

$$\text{Activitatea pe litru ser} = \frac{\Delta A}{\text{min} \cdot l \cdot \varepsilon} \cdot \frac{\text{Volumul total din cuvă}}{\text{Volumul de enzimă}}$$

Activitatea enzimatică se calculează în $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot l^{-1}$. Pentru calcularea activității enzimatice este necesară cunoașterea volumului cuvei respectiv al probei și lungimea de undă la care absoarbe un compus (format sau consumat în decursul reacției enzimatice).

6.2.2. Creatin kinaza – catalizează formarea ATP-ului din ADP și creatinfosfat. ATP-ul este o moleculă bogată în energie, folosită în special în mușchi. Creatin kinaza este un dimer care are în componență 2 lanțuri polipeptidice. Sunt 2 tipuri de monomeri B („brain"=creier) și

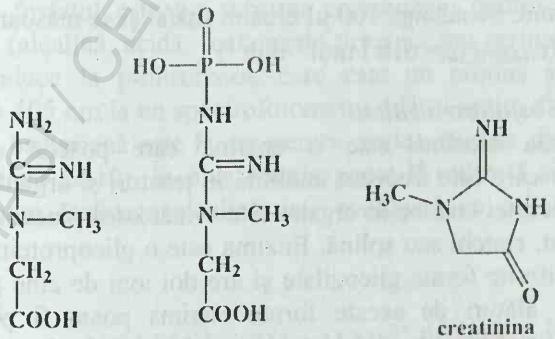
M (muşchi). Prin combinarea celor 2 tipuri de monomeri rezultă 3 izoenzime principale ale creatin kinazei (CK):

- CKMM (are în componenţă 2 monomeri M) – în muşchi;
- CKBB (are în componenţă 2 monomeri B) – în creier;
- CKMB (are în componenţă un monomer M şi un monomer B) – în muşchiul cardiac.

Pe lângă aceste izoenzime se mai semnalează şi apariţia unei alte izoenzime, CKMiMi, în cantitate mică în muşchi.

Procentul cel mai mare de creatin kinază din corp este localizat în muşchii scheletici (97% CKMM citoplasmatică). Restul se regăseşte sub forma CKMB în principal şi a unor concentraţii infime de CKBB sau CKMiMi. În muşchiul miocardic izoenzimele se află într-un raport diferit (CKMM : CKMB = 2 : 1, CKMiMi poate atinge şi 10%). În serul din plasma sanătoasă, activitatea creatin kinazei (CKMM) scade cu 94-98%. Aceste enzime trebuie mai întâi activate timp de câteva minute prin adăugarea unor compuşi tiolici (ditiotreitolul sau N-acetil-cisteina).

Creşterea concentraţiei CK/MB poate indica un risc ridicat pentru un infarct miocardic pe când creşterea concentraţiei CK/BB poate indica existenţa unui traumatism cerebral sau a unui accident cerebral vascular. Cantitatea de enzimă poate fi determinată prin dozarea colorimetrică a fosfatului cu albastru de molibden sau prin intermediul unor reacţii enzimatice cuplate.



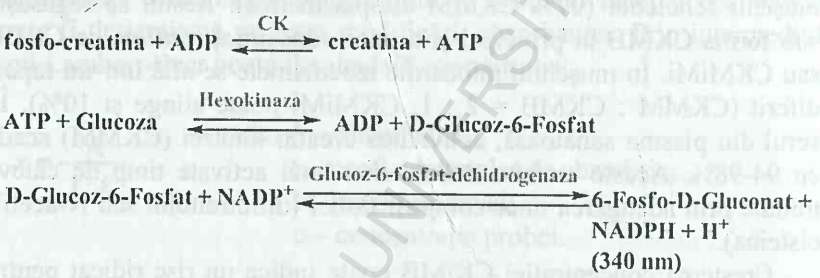
Schema 6.6. Structurile unor metaboliţi

Reactivi

Soluție tampon: 115 mM imidazol, 11,5 mM acetat de magneziu, 2,3 mM EDTA pH = 7,5.

Soluție stoc 1: 2,3 mM ADP, 5,8 mM AMP, 11,5 mM Ap5A (Diadenozin-5'-pentafosfat), 23 mM Glucoza, 2,3 mM NADP dizolvate în soluția tampon pH-ul final 7.1.

Soluție 2 (se prepară proaspăt): 23 mM N-acetil-L-cisteina, hexokinază (3500 U/l), glucoz-6-fosfat-dehidrogenază (2300 U/l) dizolvate în soluția stoc 1.



Schema 6.7. Detecția enzimatică indirectă a fosfocreatinei

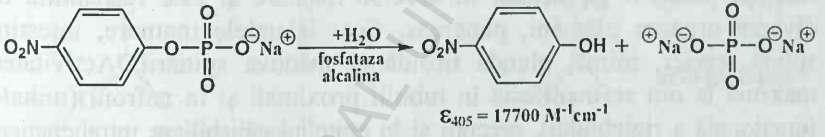
Modul de lucru

La 1 ml soluție 2 se adaugă 50 µl ser (conține creatin kinaza totală şi adenilat kinaza). Pentru reactivarea enzimelor se incubează amestecul timp de 5 min. Se adaugă 100 µl creatin fosfat şi se măsoară absorbanța la 340 nm ($\varepsilon_{NADPH,340}$= 618 l·mol^{-1}·mm^{-1})

6.2.3. Fosfataza alcalină

Fosfataza alcalină este o enzimă care posedă un domeniu membranar care este frecvent întâlnită în țesuturi şi organe. Distribuția relativă a acestei enzime în organe este următoarea placentă > rinichi > oase > ficat, rinichi sau splină. Enzima este o glicoproteină care poate exista în diferite forme glicozilate şi are doi ioni de zinc pe moleculă. Mai mult, alături de aceste forme enzima poate fi prezentă prin intermediul variantelor izoforme. În serul uman fosfataza alcalină se află sub forma unui amestec de izoenzime care provin din următoarele

surse: intestin, oase, placentă (apare în ser numai în decursul ultimelor luni de sarcină) sau formele hepatobiliare. Aceste izoenzime (cu excepția formelor hepatobiliare) pot fi diferențiate prin electroforeză în scopul diagnosticării unor afecțiuni. Modificările patologice ale acestei enzime pot fi folosite la diagnosticarea bolilor de ficat (în special a hepatitelor prin măsurarea raportului activitate fosfataza alcalină/activitate alanin amino-transferază), a unor afecțiuni osoase (rahitism, osteomalacie), cancerelor (pulmonare în care incidența izoenzimei placentare este ridicată-izoenzima Regan), boala Hodkin, sindromul Fanconi, boli ale intestinului sau infecții bacteriene abdominale. Prin inactivare (încălzire la 65 °C sau prin denaturare în prezența ureei) izoenzima din placentă rămâne stabilă, în timp ce celelalte forme sunt inactivate. Această izoenzimă poate apărea în special în cazul unor tumori. Fosfataza alcalină catalizează reacția de clivare a fosfatului din esterii fosforici la pH alcalin:



Schema 6.8. Reacția de clivare a fosfatului nitrofenolului asistată de fosfataza alcalină

p-Nitrofenil fosfatul este un substrat cromogenic pentru majoritatea fosfatazelor (alcalină, acidă, fosfatazele tirozinei sau serinei/treoninei). Reacția conduce la p-nitrofenol, care este un produs galben ușor măsurabil la 405 nm la un spectrofotometru. pH-ul optim al enzimei de proveniență bacteriană este 8, iar pentru acelea extrase din mamifere este mai ridicat (9-10). În plus reacția poate fi utilizată și în tehnica ELISA în care fosfataza alcalină este conjugată cu cel de-al doilea anticorp.

Reactivi

Soluție tampon 1: 0,1 M Glicină, 1 mM Mg^{2+}, 0,1 mM Zn^{2+} pH = 10,5.

Soluție substrat: 0,1 M p-nitrofenil fosfat (M = 371,1; 37 mg/ml soluție).

Soluție 2 (se prepară proaspătă): 23 mM N-acetil-L-cisteină, hexokinază (3500 U/l), glucoz-6-fosfat-dehidrogenază (2300 U/l) dizolvate în soluția stoc 1.

Modul de lucru

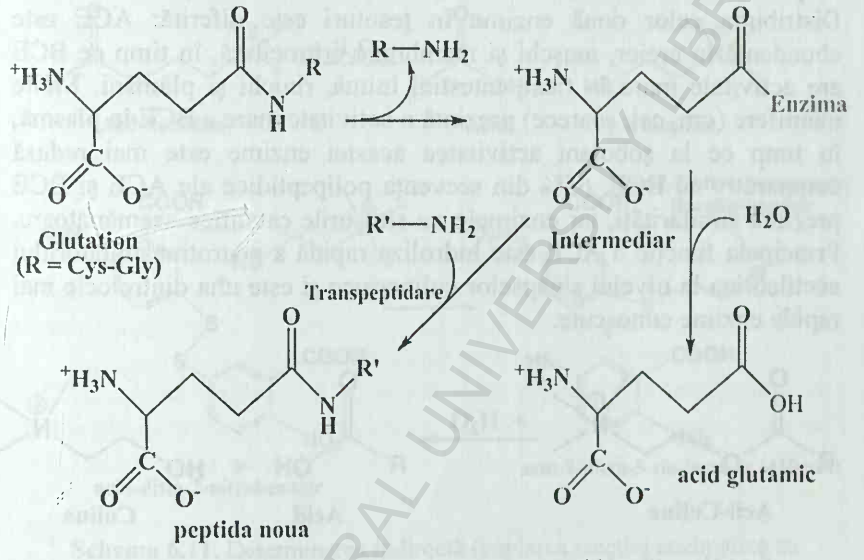
La 940 µl soluție tampon se pipetează 10 µl substrat. Se adaugă un volum de 50 µl ser și se măsoară absorbanța în timp (2-3 min) la lungimea de undă de 405 nm (ε_{405}=18500 $M^{-1}cm^{-1}$). Se repetă măsurătorile utilizând diverse concentrații de enzimă (5 µl, 10 µl, 20 µl ser) la aceeași concentrație de substrat având grijă să se mențină același volum final (1 ml). Toate măsurătorile se execută în triplicat. De asemenea, se vor face măsurătorile pentru probele oarbe, în care serul nu este prezent.

6.2.4. γ-Glutamil-traspeptidaza

γ-Glutamil-traspeptidaza este o glicoproteină (are 20% zaharuri). Enzima poate fi glicozilată în diverse maniere și este răspândită în diverse organe: plămâni, pancreas, ficat, glandele mamare, intestin, splină, creier, inimă, glanda tiroidă și măduva spinării. Activitatea maximă la om se manifestă în tubulii proximali și în nefroni (unitate funcțională a rinichiului), precum și în epiteliul căii biliare intrahepatice. Enzima apare în țesuturile umane atât în stare liberă cât și în stare legată (la suprafața celulei). Forma solubilă se regăsește în ser sau în urină. În formă legată enzima transferă un rest glutamil de pe glutation pe un aminoacid, care se găsește pe suprafața exterioară a plasmei membranare. Glutamil-aminoacidul este trecut prin membrană, după care restul glutamil este îndepărtat cu ajutorul γ-glutamil-ciclo-transferazei și este transformat în 5-oxoprolină. În acest mod amino-acizii pot fi transportați în celulă.

O creștere a activității acestei enzime în ser poate sugera boli de ficat, pancreas sau ale căilor biliare. De asemenea, în cazul hepatitelor acute (A și B) se constată o crește a concentrației γ-glutamil-traspepti-dazei, dar nu mai mare decât cea a transaminazelor. În cazul hepatitelor cronice alcoolice valorile concentrațiilor cresc vertiginos (de până la 10 ori). În cazul pancreatitelor acute valorile concentrațiilor enzimei sunt ridicate pentru un timp mai scurt. Cuantificarea acestei enzime din

plasmă poate permite o diferențiere dintre bolile de ficat și cele ale oaselor (în această situație valorile concentrației γ-glutamil-traspeptidazei rămân neschimbate).



Schema 6.9. Reacția de transpeptidare

Reactivi

Soluție 1: 0,180 M Glicil-glicină pH = 7.9;

Soluție 2: 66 mM L-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilidă;

Reactiv de lucru: la 1 ml soluție 2 se adaugă 9 ml și 90 mg NaCl.

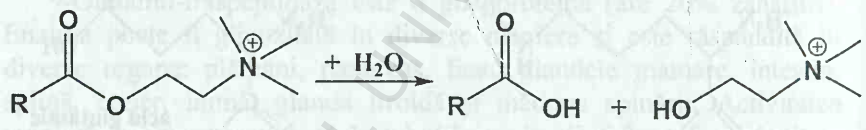
Modul de lucru

La 1000 µl soluție tampon se adaugă 100 µl ser și se măsoară absorbanța în timp 410 nm (ε_{410} = 790800 $M^{-1}cm^{-1}$).

Colinesterazele

Colinesterazele sunt enzime larg răspândite atât în țesuturi cât și în plasmă sau alte fluide din corp. În funcție de specificitatea lor pentru substrat și de susceptibilitatea pentru anumiți inhibitori se disting două clase de colinesteraze: acetil-colinesteraza (ACE) și butilil-colineste-

raza (BCE sau pseudocolinesteraza). ACE hidrolizează acetilcolina mai rapid, comparativ cu alți colinesteri și are activitate mai mică pentru butirilcolina. Spre deosebire de ACE, BCE acționează preferențial asupra substratului butiril-colina, dar hidrolizează și acetilcolina. Distribuția celor două enzime în țesuturi este diferită: ACE este abundentă în creier, mușchi și membrana eritrocitară, în timp ce BCE are activitate mare în ficat, intestin, inimă, rinichi și plămâni. Multe mamifere (om, cal, șoarece) prezintă o activitate mare a BCE în plasmă, în timp ce la șobolani activitatea acestei enzime este mai redusă comparativ cu BCE. 65% din secvența polipeptidice ale ACE și BCE prezintă similarități, iar enzimele au situsurile catalitice asemănătoare. Principala funcție a ACE este hidroliza rapidă a neurotransmițătorului acetilcolina la nivelul sinapselor colinergice și este una dintre cele mai rapide enzime cunoscute.



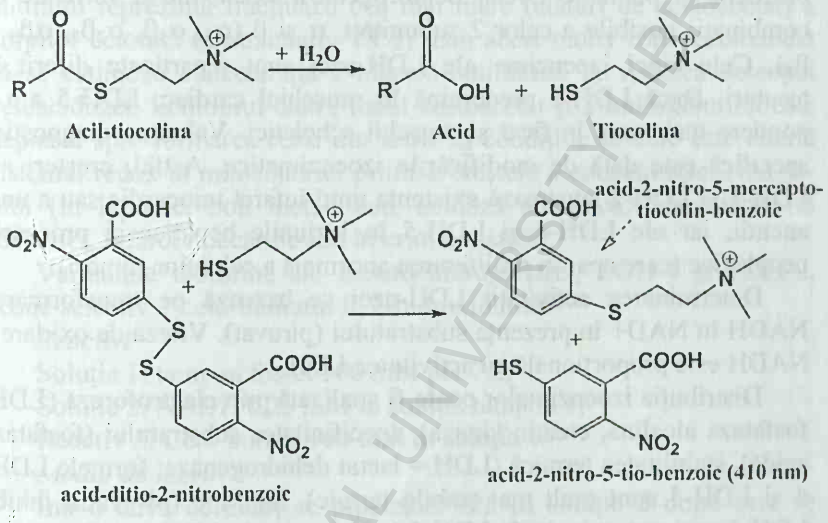
Acil-Colina **Acid** **Colina**

R = CH_3 acetil-colina
R = C_3H_7 butiril-colina

Schema 6.10. Reacția catalizată de coliesteraze

Pseudocolinesteraza serică (BCE) este o enzimă secretată activ în plasmă îndeosebi de către ficat. Scăderea concentrației acestei enzime poate fi asociată cu insuficiențe hepatice (hepatite, ciroze), în intoxicațiile cu compuși organofosforici sau în cazul unor pacienți cu denutriție proteică gravă. Creșteri ale concentrației acestei enzime apar în cazul sindromului nefrotic, în perioada de vindecare a unei hepatite, precum și la obezi sau diabetici. Activitatea enzimei (și implicit cantitatea acesteia) se poate determina prin cuplarea reacției enzimatice cu o reacție colorimetrică. În decursul reacției enzimatice enzima accelerează reacția de hidroliză a butiril-tiocolinei la tiocolină.

Produsul rezultat reacționează cu DNTB (acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic) conducând la un produs galben:



Schema 6.11. Determinarea indirectă (cuplarea reacției enzimatice cu reacția de culoare) a coliesterazelor

BCE este o enzimă care are un rol important în detoxifiere. Din acest motiv BCE are importanță farmaceutică și toxicologică deoarece hidrolizează medicamentele de tip esteric și captează neuroinhibitorii organofosforici înainte de a atinge ținta sinaptică.

Reactivi

Soluție 1: fosfat de potasiu 50 mM pH = 7.4;

Soluție 2: reactivul Ellman 0,3 mM în soluția tampon 1;

Reactiv 3: butiriltiocolina 90 mM.

Modul de lucru

Într-o cuvă din plastic se pipetează 960 µl soluție 2, după care se adaugă 30 µl de reactiv 3. După omogenizarea amestecului, se pipetează 10 µl ser și se măsoară absorbanța în timp la lungimea de undă 410 nm (ε_{410} = 13.600 $M^{-1}cm^{-1}$).

6.2.5. Lactat dehidrogenaza

Se găseşte în cantităţi mari în muşchiul striat, ficat, miocard, rinichi şi în ganglionii limfatici, iar în cantităţi mai reduse în pancreas, eritrocite şi plămâni. Lactat dehidrogenaza există într-o varietate de combinaţii posibile a celor 2 subunităţi, α şi β (α_4, $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$ şi β_4). Cele cinci izoenzime ale LDH-azei sunt repartizate diferit în ţesuturi. Dacă LDH-1 predomină în muşchiul cardiac, LDH-5 are o pondere mai mare în ficat şi muşchii scheletici. Valoarea diagnostică specifică este dată de modificările izoenzimatice. Astfel, creşteri ale LDH-1 şi LDH-2 sugerează existenţa unui infarct miocardic sau a unei anemii, iar ale LDH-4 şi LDH-5 în leziunile hepatice şi procesele neoplazice (care apar în proliferarea anormală a celulelor-tumori).

Determinarea activităţii LDH-azei se bazează pe transformarea NADH în NAD+ în prezenţa substratului (piruvat). Viteza de oxidare a NADH este proporţională cu activitatea LDH.

Distribuţia izoenzimelor poate fi analizată prin electroforeză (LDH, fosfataza alcalină, creatin kinaza), specificitatea substratului (fosfataza acidă), stabilitatea termică (LDH = lactat dehidrogenaza; formele LDH-4 şi LDH-5 sunt mult mai stabile termic), inhibiţie (piruvatul inhibă LDH-1 mai puternic decât LDH-5). Izoenzimele LDH pot fi separate din ser prin electroforeză pe folii de acetat de celuloză, în gel de amidon, agar, poliacrilamidă şi pot fi vizualizate printr-o reacţie de culoare. În plus, anticorpii monoclonali (vezi technica Western Blot) pot fi utilizaţi la detecţia izoenzimelor.

Reactivi

Soluţie 1: Tris 100 mM conţinând 200 mM NaCl pH 7.2;

Solutie 2: NADH 0,25 mM în soluţia tampon 1;

Reactiv 3: piruvat 10 mM în soluţia 1.

Modul de lucru

Într-o cuvă de cuarţ se pipetează 800 µl soluţie 2, după care se adaugă 20 µl de ser. Se omogenizează amestecul şi se adaugă 200 µl reactiv 3 şi se măsoară absorbanţa în timp la lungimea de undă 334 nm ($\varepsilon_{410} = 6200\ M^{-1}cm^{-1}$).

6.2.6. Hidroxibutirat dehidrogenaza

În cazul indivizilor sănătoşi, corpii cetonici sunt prezenţi în concentraţii reduse (totalul cetonelor serice < 0,5 mmol/l). 2-hidroxi-butiratul reprezintă fracţiunea cea mai mare (alături de acetoacetat) a corpilor cetonici (aproximativ 78%). Din acest motiv este recomandat să se estimeze concentraţia 2-hidroxi-butiratului în vederea detecţiei cetoacidozei. Echilibrul dintre ionul acetoacetat şi 2-hidroxibutirat este deplasat spre formarea celui din urmă în condiţiile în care este alterat sistemul redox al mitocondriei printr-o creştere a concentraţiei NADH-ului (în hipoxie, boli metabolice, acidoză alcoolică, cetoacidoza la diabetici, infarct miocardic sau în criminalistică).

Variantele izoforme ale lactatdehidrogenazei, LDH-1 şi LDH-2, reduc selectiv 2-ceto-butiratul la 2-hidroxibutirat.

Reactivi

Soluţie 1: tampon fosfat 100 mM pH 7.2;

Soluţie 2: NADH 0,25 mM în soluţia tampon 1;

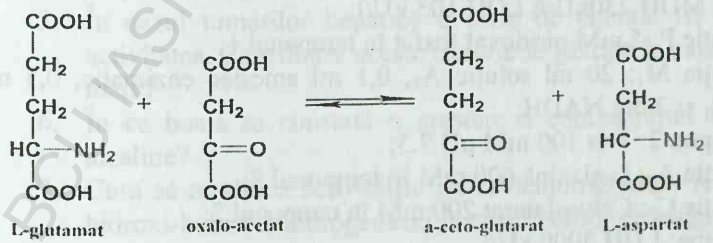
Reactiv 3: Ceto-butirat 100 mM în soluţia 1.

Modul de lucru

Într-o cuvă de cuarţ se pipetează 925 µl soluţie 2 după care se adaugă 25 µl de ser. Se omogenizează amestecul şi se monitorizează absorbanţa la 334 nm până când valoarea acesteia se menţine constantă. Se pipetează 50 µl reactiv 3 şi se măsoară absorbanţa în timp la lungimea de undă de 334 nm ($\varepsilon_{334} = 6200\ M^{-1}cm^{-1}$).

6.2.7. Aminotransferazele

Aminotransferazele care catalizează următoarea reacţie:



Schema 6.12. Reacţia catalizată de aminotrasferaze

Activitatea enzimatică a aminotransferazelor poate fi monitorizată prin cuplarea acesteia cu reacțiile malat sau lactat dehidrogenazei, reacții în care are loc oxidarea NADH la NAD+ (observată la 340 nm).

Piruvatul rezultat din reacția enzimatică poate fi dozat colorimetric în mediu alcalin cu 2,4-dinitrofenilhidrazina cu formarea hidrazidei corespunzătoare.

Cele două amino-transferaze sunt enzime care participă la metabolismul din interiorul celulelor hepatice, dar apar în cantități reduse în miocard, musculatura striată sau rinichi. Aceste enzime sunt eliberate din ficat când unele celule devin necrotice (de exemplu în hepatite toxice sau ciroză) și pot fi monitorizate în ser în decursul timpului pentru a urmări evoluția bolii.

Aspartat aminotransferaza (TGO) se găsește în proporție de 60% în citoplasmă și 40% în mitocondrii. Creșterea moderată (de până la 10 ori) a concentrației enzimei poate fi asociată cu hepatita cronică sau medicamentoasă, ciroză sau icter și uneori cu miocardii sau distrofii musculare. Creșteri semnificative (concentrații de 10-100 ori mai mari decât valorile normale) pot fi observate în cazul infarctului miocardic.

Creșteri relevante (de 10-100 ori) ale concentrației alanilamino-transferazei (TGP) sugerează existența unei hepatite virale acute sau a unei necroze toxice a ficatului. Creșteri moderate indică aceleași patologii cu cele date de AST.

Reactivi

Tampon 1: Tris 100 mM pH 7.8;

Solutie A_1: Aspartat 300 mM în tamponul 1;

Solutie C_1: 2-cetoglutarat 150 mM în tamponul 1;

Amestec enzime: MDH/LDH (malat dehidrogenaza/lactat dehidrogenaza); MDH 230kU/l; LDH 105 kU/l;

Soluție P: 5 mM piridoxal fosfat în tamponul 1;

Soluția M_1: 20 ml soluție A_1, 0,1 ml amestec enzimatic, 0,5 ml soluție P_1 și 3 mg NADH;

Tampon 2: Tris 100 mM pH 7.3;

Soluție A_2: L-alanină 600 mM în tamponul 2;

Soluție C_2: Ceto-glutarat 200 mM în tamponul 2;

Enzima: LDH 3000 kU/l;

Soluție P_2: 5 mM piridoxal fosfat în tamponul 2;
Soluția M_1: 20 ml soluție A_2, 0,1 ml enzimă, 0,5 ml soluție P_2 și 3 mg NADH.

Modul de lucru

Într-o cuvă de cuarț se pipetează 800 µl soluție M_1/M_2, după care se adaugă 100 µl de ser (activitatea enzimei TGO se măsoară utilizând soluțiile cu indicii 1, iar activitatea enzimei TGP prin utilizarea reactivilor cu indicii 2). Se omogenizează amestecul și se monitorizează absorbanța la 334 nm până când valoarea acesteia se menține constantă. Se pipetează 100 µl reactiv C_1/C_2, se omogenizează amestecul (cuva se acoperă cu Parafilm și se agită prin inversare de 2-3 ori) și se măsoară absorbanța în timp la 334 nm ($\varepsilon_{334} = 6200\ M^{-1}cm^{-1}$).

Întrebări

1. O apoenzimă este o enzimă:
   a) hidratată;
   b) dezactivată;
   c) fără cofactor.
2. Aminotransferazele catalizează reacția:
   a) unui aminoacid cu acetil-CoA;
   b) unui aminoacid cu un cetoacid;
   c) de transfer a unui aminoacid pe un lanț proteic.
3. În ce afecțiuni cresc activitățile enzimatice ale creatin kinazei, lactat dehidrogenazei, hidroxi-butiril dehidrogenazei și aspartat aminotransferazei?
4. În ce situații clinice valorile activității enzimatice ale colin esterazei sunt modeste?
5. În cazul tumorilor hepatice o serie de enzime își modifică activitatea. Care dintre aceste enzime se găsește în cantitate mai mare?
6. În ce boală se constată o creștere a concentrației fosfatazei alcaline?
7. Cum se modifică activitățile lactat dehidrogenazei respectiv a hidroxi-butiril dehidrogenazei în cazul bolilor de sânge?

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

1. Salomons, G.S. şi Wyss, M. (Eds) (2007) Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease, Subcellular Biochemistry, 46, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
2. Vial, C. (Ed) (2006) Creatine Kinase, Nova Science Publishers, New York.
3. Bong, S.M. şi colab. (2008) Structural studies of human brain-type creatine kinase complexed with the ADP-Mg^{2+}-NO^{3-}creatine transition-state analogue complex, *FEBS Letters*, **582**, 3959-3965.
4. Parker, J.N. şi Parker, P.M. (Eds) (2004), Alkaline phosphatase: A medical dictionary, bibliography, and annotated research guide to internet references, ICON Health Publication, San Diego, USA.
5. Nachmansohn, D. (1940) On the physiological significance of choline esterase, *Yale J. Biol. Med.*, **12(5)**, 565-589.
6. Drent, M., Cobben, N.A.M., Henderson, R.F., Wounters, E.F.M., van Dieijen-Visser, M. (1996) Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage and inflammation, *Eur. Respir. J.*, **9**, 1736-1742.
7. Sena, S.F. (2010) Beta-hydroxybutyrate: New Test for Ketoacidosis, *Technically Speaking*, 4(8).
8. Dörner, K. (2009) Klinische Chemie und Hämatologie: Taschenlehrbuch (7 Auflage), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, p. 128-141.
9. Linnemann, M. şi Kühl, M. (2005) Biochemie für Mediziner. Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug, Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 155-162.
10. Gaw, A., Cowan, R.A., O'Reilly, D.St.J., Stewart, M.J. şi Shepherd, J. (1999) Clinical Biochemistry An Illustrated Colour Text (2nd edition), Harcourt Brace, Edinburgh.
11. Gasper, M.C. şi Gilchrist, J.M. (2005) Creatine kinase: a review of its use in the diagnosis of muscle disease, *Medicine and Health Rhode Island.*

BCU IAŞI

Capitolul 7

Metode spectroscopice

7.1. Fotometrie UV-VIS

Spectrul electromagnetic este compus din unde continue care posedă lungimi de undă sau energii diferite. Câteva regiuni ale spectrului electromagnetic prezintă importanță în studiile biochimice: razele X (cristalografia cu raze X, $\lambda > 7$ nm), domeniul ultraviolet (UV, 180-340 nm), domeniul infraroşu (IR, 1-100 μm) şi radiofrecvențele (RMN, 10^6-10^{10} nm). Fotonii cu o anumită energie pot trece electronii de valență ai moleculelor în stare excitată şi de asemenea pot transfera energie unei molecule (absorbție). Energia absorbită corespunde diferenței dintre două nivele energetice ale moleculei (de exemplu, pentru gruparea carbonil pot apărea tranziții de tip π-π^* sau n-π^*, unde: n-orbital de nelegătură; π/π^*-orbital de legătură/antilegătură).

În cazul proteinelor absorbția în domeniul UV-VIS poate fi pusă pe seama unor grupe funcționale:

a) Legătura peptidică (tranziții π-π^*, absorbție intensă la 190 nm; tranziții n-π^*, absorbție moderată la 210-220 nm);
b) Aminoacizii aromatici (tranziții π-π^*, fenilalanina 260 nm, tirozina 275 nm, triptofan 280 nm, cuantificarea grosieră a proteinelor se face prin măsurarea absorbției la 280 nm);
c) Cofactorii enzimatici (NAD-ul, FAD-ul, FMN-ul, nuclee porfirinice, ioni metalici);

Absorbția acizilor nucleici poate fi pusă pe seama bazelor purinice şi pirimidinice (tranziții π-π^* corespunzătoare nucleelor aromatice,

BCU Cluj / BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

tranziții π-π^* datorate heteroatomilor, tranziții π-π^* sau n-π^* atribuite grupărilor carbonilice). Acizii nucleici prezintă un maxim de absorbție la 260 nm.

Spectrul de absorbție UV-VIS

Spectrul de absorbție UV-VIS reprezintă spectrul rezultat la absorbția luminii de către biomoleculă în funcție de lungimea de undă. Legea *Lambert-Beer* (vezi capitolul 6.2.1) este folosită frecvent în spectrometrie.

Coeficientul molar de absorbție, ε, este o constantă caracteristică fiecărei biomolecule și se definește ca fiind absorbanța unei soluții de concentrație 1 M aflată într-o cuvă cu drumul optic de 1 cm la lungimea de undă specificată într-un solvent (soluție tampon) bine precizat.

Probleme

1. Absorbanța, A, a unei soluții de flavin adenin dinucleotid (FAD) este de 0,34 la 450 nm. Valoarea coeficientului molar de absorbție, ε, al FAD-ului este 11.300 $M^{-1}cm^{-1}$, iar drumul optic al cuvei este de 1 cm. Determinați concentrația molară a FAD-ului. Ce absorbanță ar avea soluția în situația în care se folosește o cuvă cu drumul optic de 0,5 cm?
2. O soluție de hemoglobină de concentrație 50 µM are o absorbanță de 0,73 la 577 nm. Considerând faptul că drumul optic al cuvei este de 1 cm determinați coeficientul molar de absorbție al hemoglobinei la lungimea de undă menționată.

Aplicații ale fotometriei UV-VIS

Spectroscopia UV-VIS poate avea multiple aplicații:

- Măsurarea concentrației unei biomolecule în soluție;
- Identificarea unor biomolecule dintr-o probă necunoscută (cofactori etc.);
- În cinetica enzimatică (vezi capitolul 6.2.1);
- Determinarea interacțiunilor proteină-ligand;
- Dozarea unor compuși biochimici;
- Deducerea conformației secundare a proteinelor;

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

- Monitorizarea creşterii unor bacterii (valoarea absorbanţei unei suspensii de bacterii dintr-un mediu de cultură poate fi corelată cu densitatea bacteriilor – de obicei $OD_{580} = A_{580} = 1$ reprezintă o concentraţie de 10^9 celule/ml).

7.2. Măsurători de turbiditate

Lumina incidentă este împrăştiată în suspensii, emulsii sau soluţii coloidale (efectul Tyndal).

În principiu, doi parametri pot fi măsuraţi: atenuarea luminii incidente (turbidimetria) sau intensitatea luminii împrăştiate (nefelometria; din limba greacă „nephel"=nor).

Dacă măsurătorile de turbiditate pot fi efectuate cu ajutorul spectrofotometrului, măsurătorile nefelometrice necesită folosirea unui fluorimetru (în care lungimea de undă cu care se excită proba coincide cu lungimea de undă a radiaţiei emise). Configuraţia fotometrului, în special poziţia şi volumul cuvei, lăţimea fantei sunt esenţiale pentru măsurătorile de turbiditate. În situaţia în care cuva este în apropierea fotomultiplicatorului intensitatea radiaţiei emise este mai mare. Pentru calibrare se foloseşte o soluţie standard de formazină. Numărul de celule de *E coli* care cresc în mediu de cultură LB (Luria Bertani) poate fi estimat prin turbidimetrie. Cultura este plasată într-o cuvă de cuarţ, iar lungimea de undă folosită atât pentru excitate cât şi pentru emisie este de 600 nm.

7.3. Fluorescenţa şi bioluminiscenţa

În urma interacţiunii fotonilor cu electronii de valenţă ai moleculelor aceştia trec de pe orbitalii din starea fundamentală pe orbitalii cu nivele de energie mai ridicate. O parte din molecule nu rămân pentru o perioadă foarte lungă în această stare excitată şi revin la starea iniţială printr-un proces de relaxare (de obicei datorită proceselor de coliziune cu solventul sau însoţit de emisie de fotoni). Acest proces de relaxare în care se emite lumina poartă numele de fluorescenţă. De remarcat este faptul că lungimea de undă a luminii emise este mai mare decât aceea a lungimii de undă cu care s-a excitat proba. Deoarece atât starea fundamentală cât şi cea excitată sunt degenerate (au mai multe nivele

de vibrație în aceste stări) în cazul excitării la o singură lungime de undă se obține un spectru de emisie și vice-versa.

Randamentul cuantic

Intensitatea fluorescentei poate fi corelată cu parametrul numit „randament cuantic" sau Q care descrie probabilitatea de apariție a fluorescenței (raportul dintre numărul de fotoni emiși și numărul de fotoni absorbiți). Mediul extern, în care se află un compus biochimic, poate influența în mod hotărâtor randamentul cuantic. Această proprietate este folosită pentru studierea conformației moleculelor (proteinelor) sau pentru interacțiunile dintre molecule mai mici și molecule mai mari. Stingerea sau mărirea fluorescenței unei biomolecule poate fi explicată prin transferul energiei dintre această moleculă și partenerul din soluție. Un număr semnificativ de biomolecule prezintă fluorescență (vezi tabelul 7.1). Aminoacizii cu grupări aromatice (fenilalanina, tirozina și triptofanul) sunt fluorescenți, și din acest motiv peptidele sau proteinele care conțin acești aminoacizi sunt fluorescente. Fluorescența proteinelor este dictată în special de triptofan, deoarece fenilalanina are un randament cuantic scăzut, iar tirozina este „mascată" la majoritatea proteinelor. Fluorescența datorată numai resturilor de triptofan poate fi selectiv măsurată prin excitare la 295 nm, deoarece această lungime de undă nu se suprapune peste absorbția tirozinei.

Fluorescența triptofanului este influențată de polaritatea mediului, iar spectrul de emisie se deplasează spre lungimi de undă mai mici (deplasare spre albastru) în cazul creșterii hidrofobicității. Schimbările spectrului de emisie a triptofanului pot fi puse pe seama modificărilor conformaționale, asocierea subunităților unei proteine, legarea unui ligand la aceasta sau denaturarea, fenomene care afectează modificarea vecinătăților nucleului indolic.

De asemenea, bazele purinice și pirimidinice (adenina, guanina, citozina, uracilul) care intră în componența acizilor nucleici (ADN-ului sau ARN-ului) și cofactorii organici (NAD-ul sau FAD-ul) prezintă fluorescență.

Informații utile pot fi obținute și în cazul utilizării unor fluorofori artificiali. Interacțiunea dintre asemenea fluorofori și proteine sau acizii

nucleici poate fi folosită la marcarea acestor compuşi sau la identificarea lor (prin legare necovalentă).

Fluorescenţa este o tehnică sensibilă, dar migăloasă. Claritatea soluţiilor şi puritatea solvenţilor pot influenţa în mod radical valorile citite. Din acest motiv iniţial soluţiile se vor filtra sau centrifuga înainte de citire. După utilizare, cuvele din cuarţ vor fi curăţate cu alcool de puritate ridicată şi apă bidistilată. Valorile fluorescenţei sunt influenţate de temperatură şi din acest motiv spectrofluorimetru trebuie să fie echipat cu un sistem de termostatare a cuvelor.

Tabel 7.1. Exemple de fluorofori şi maximele lor de absorbţie şi emisie

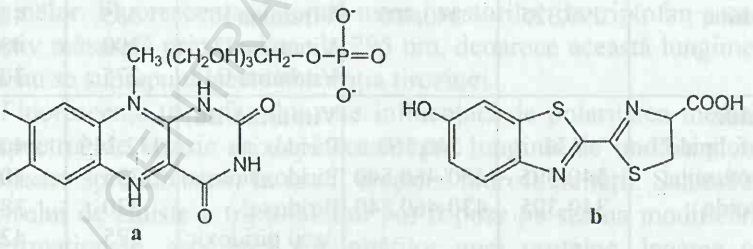
Fluorofor	$\lambda_{ex, max}$ (nm)	$\lambda_{em, max}$ (nm)	Fluorofor	$\lambda_{ex, max}$ (nm)	$\lambda_{em, max}$ (nm)
Aminoacizi			**Cofactori**		
Triptofan	280	350	FAD (flavine)	450	535
Tirozina	275	300	NADH	290,351	440,460
Fenilalanina	260	280	NADPH	336	464
Proteine			**Vitamine**		
Colagen	325	400,405	Vitamina A	327	510
Elastina	290,325	340,400	Viramina K	335	480
			Vitamina D	390	480
			Vitamina B12	275	305
Lipide			**Vitamina B6**		
Fosfolipide	436	540,560	Piridoxina	332,340	400
Lipofuscina	340-395	430-460,540	Piridoxamina	335	400
Ceroide	340-395	430-460,540	Piridoxal	330	385
			Acid piridoxic	325	425
			Piridoxal fosfat	330	400
Porfirine	400-450	630, 690			

Bioluminiscenţa

Bioluminiscenţa este asociată cu fenomenul în care lumina este produsă de către diverse organisme. Animalele care pot produce lumina sunt denumite bioluminiscente. Bioluminiscenţa se poate prezenta sub diverse culori de la violet la roşu. Culoarea dominantă de pe pământ

este verde datorită faptului că aceasta este „reflectată" corespunzător de către plantele verzi. Un exemplu îl constituie licuricii care emit blițuri de lumină de culoare galbenă-verzuie. Pe de altă parte în oceane organismele bioluminiscente emit preponderent lumina de culoare albastră datorită faptului că această lumină se transmite mai bine prin apa mărilor, care poate să împrăștie sau să absoarbă lumina. Dinoflagelatele (organisme marine unicelulare ce intră în componența planctonului) pot emite lumină de culoare albastră (în intervalul 440-480 nm) în timpul nopții în jurul scafandrilor. Există câteva motive care stau la baza evoluției bioluminiscenței: camuflajul, atracția sau repulsia între specii, comunicarea sau iluminarea. Lumina emisă de către aceste organisme este rezultatul unor reacții chimice.

Bioluminiscența este un proces în care cantitățile de căldură produse sunt relativ mici. „Lumina rece" este rezultatul unei conversii energetice foarte eficiente. În general o reacție bioluminiscentă se desfășoară cu ajutorul a trei componente: oxigen, luciferină (un substrat) și luciferaza (o enzimă care folosește drept substrat luciferina). Organismele produc diferite variante ale luciferinei:

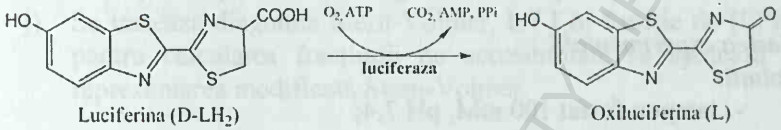


Schema 7.2. Exemple de substrat folosit în reacțiile chimice care însoțesc bioluminiscența:

a) luciferina bacteriană (forma redusă a riboflavin monofosfatului);
b) luciferina licuricilor sau viermilor „strălucitori"(b).

Luciferina se oxidează în prezența luciferazei, a oxigenului și ATP-ului proces în urma căruia rezultă oxiluciferina și lumină. Uneori

primele trei componente se regăsesc împreună sub formă de fotoproteină. Reacția enzimatică poate fi dictată de concentrația unor ioni (de exemplu ionii de Ca^{2+}) din mediu respectiv, fapt care permite organismelor să controleze aceste procese de bioluminiscență.



Luciferina (D-LH_2) Oxiluciferina (L)

Schema 7.3. Reacția enzimatică catalizată de luciferază

Experiment de stingere a fluorescenței

Considerații teoretice

Prin stingere se înțelege orice proces care conduce la o descreștere a intensității fluorescenței. Din punct de vedere al fenomenelor fizice acest proces este datorat pierderii absorbției sau descreșterii randamentului cuantic. De exemplu, foto-oxidarea și transferul de energie sunt procese de stingere a fluorescenței. În particular, există două modalități de stingere a fluorescenței: dinamică sau statică. Stingerea dinamică se referă la orice proces care apare în timpul de viață al stării excitate a fluoroforului și conduce la pierderea fluorescenței. De exemplu, prin coliziunea fluoroforului cu atomii grei (de brom sau iod) au loc cuplaje de tip spin-orbită, iar electronul excitat al fluoroforului poate trece în stare excitată triplet. Dependența variației fluorescenței în funcție de concentrația stingătorului poate fi reprezentată grafic prin intermediul ecuației:

$$I_o / I = 1 + K_{sv}[Q]$$

unde I și I_o sunt intensitățile în prezența și în absența stingătorului (Q) iar Ksv este constanta Stern-Volmer.

Fluorescența statică este un fenomen care apare în starea fundamentală a fluoroforului (se formează un complex stingător-fluorofor sau mole-culele stingătorului se află în „sfera de stingere" a fluoroforului) sau imediat după excitarea acestuia.

În multe sisteme apar ambele procese de stingere (dinamic sau static) şi din acest motiv ecuaţia folosită este:

$$I_o / I = (1 + K_{sv}[Q])(1 + K_a[Q])$$

unde K_a este constanta de asociere pentru stingerea statică.

Partea experimentală
Soluţii:

- tampon fosfat 100 mM, pH 7,4;
- NaCl 3M;
- triptofan 50 μM dizolvat în apă bidistilată;
- KI 1M în apă bidistilată;
- BSA 5 mg/ml (albumină serică bovină)
- OVA 9 mg/ml (albumina din albuşul de ou poate fi extrasă din albuş şi diluată 1:10 în soluţia tampon)

Modul de lucru

a) Se prepară o soluţie de triptofan 5 μM (în tampon fosfat) prin diluarea soluţiei stoc iniţiale;
b) Se deschide calculatorul şi fluorimetrul;
c) Se fixează lungimea de undă pentru excitare la lungimea de undă 280 nm, iar intervalul de emisie 300-400 nm;
d) Se citeşte maximul de emisie al triptofanului şi se înregistrează spectru de excitare menţinând acest maxim de emisie şi variind de aceasta dată excitarea (240-340 nm);
e) Se repetă ultimii doi paşi pentru soluţiile de 0,1 mg/ml OVA sau 0,2 mg/ml BSA;
f) Se prepară o serie de probe în eprubete, de 5 ml, în care se menţine constantă concentraţia triptofanului şi se variază concentraţia de KI;
g) Se fixează lungimile de undă pentru excitare şi emisie (în funcţie de maximele obţinute din spectrele anterioare) şi se măsoară fluorescenţa;

BCU IAŞI - CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

h) Analog, se efectuează măsurători pentru soluții de 0,1 mg/ml OVA sau 0,2 mg/ml BSA, soluții în care concentrația KI variază;
i) Se repetă experimentul de stingere menținând aceeași concentrație pentru proteină (0,2 mg/ml BSA) în prezența NaCl 2M;
j) Se trasează diagrama Stern-Volmer, I_0 / I în funcție de [I⁻] iar pentru calcularea fracțiunii de accesibilitate se apelează la reprezentarea modificată Stern-Volmer.

Întrebări

1) În ce situație (în care dintre cele două proteine) triptofanul este într-un mediu mai hidrofob?
2) Este stingerea BSA-ului similară cu aceea a OVA-ului?
3) Din ce motive se schimbă profilul reprezentării la concentrații mari de sare în cazul BSA-ului?
4) Câte resturi de triptofan are BSA-ul? Câte resturi sunt expuse stingerii?

Bibliografie:

1. Hemmes, G.G. (2005), Spectroscopy for the biological sciences, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 36-46.
2. Hollas, J.M. (2004) Modern Spectroscopy, 4th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 27-33.
3. Shen, X., Yang, X.-L., Zhang, X.R., Cui, Z.J., Kricka, L.J. și Stanley, P.E. (Eds) (2008) Proceedings of the 15th International Symposium on Bioluminiscence and chemiluminiscence Light emission: Biology and scientific application, Word Scientific Publishing Co.,13-17 Mai, Shangai, China.
4. Shimomura, O. (2006) Bioluminiscence: chemical principles and methods, Word Scientific Publishing Co., MA, USA.
5. Moller, M. și Denicola, A. (2002) Laboratory Excercises. Protein Tryptophan Accesibility Studied by Fluorescence Quenching, 30 (3), 175-178.
6. Lacowicz, J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd Edition, Springer, NY.
7. Valeur, B. (2001) Molecular Fluorescence: principles and application, Wiley-VCH.

7.4. Rezonanța magnetică nucleară

În cazul acestei tehnici proba de analizat (metabolitul, proteina) este dizolvată într-un lichid şi plasată în câmp magnetic variabil după care se observă/determină frecvența la care nucleele magnetice intră în rezonanță cu câmpul indus. Dacă în trecut această tehnică era folosită în special pentru elucidarea structurii chimice a moleculelor mai mici, astăzi, datorită posibilităților de analiză, această tehnică permite analiza unor molecule mai complexe.

Toate nucleele posedă o sarcină pozitivă. Pentru unele nuclee, această încărcare conferă proprietatea de spin, fapt care permite nucleelor să se comporte asemeni unor magneți mai mici.

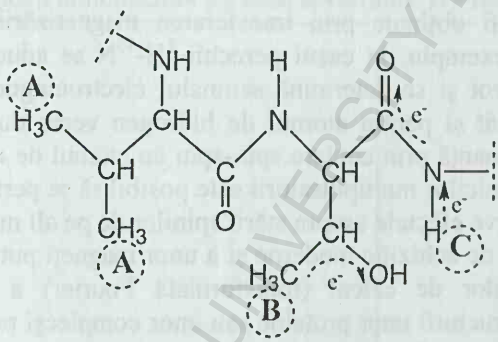
Momentul unghiular de spin depinde de valorile numărului cuantic de spin, I. Dacă I este un număr întreg nucleul nu are moment magnetic şi ca atare nu dă nici un semnal în RMN. În situația în care I este fracționar, nucleul posedă spin, iar la aplicarea unui câmp magnetic aceştia se orientează paralel sau antiparalel față de câmpul magnetic extern. La rezonanță spinul nucleului îşi schimbă orientarea.

În cazul tehnicii de rezonanță magnetică nucleară se măsoară diferența de energie la trecerea de la o stare de spin la alta. Absorbția energiei poate fi detectată prin scanarea pe un interval de frecvență şi măsurarea absorbției care cauzează tranziția între cele două stări de spin.

Tehnica RMN are o serie de aplicații în biochimie şi medicină. Structura multor compuşi biologici simpli a fost elucidată prin ^{1}H-RMN. Protonii se pot situa lângă atomi diferiți sau în medii diferite. Două caracteristici experimentale importante *deplasarea chimică* şi *cuplajul spin-spin* oferă informații structurale prețioase. Deplasarea chimică (δ) a nucleului care absoarbe radiația este măsurată în părți pe milion (ppm) şi reprezintă poziția spectrală a rezonanței relative față de un standard, în mod uzual tetrametilsilan. Semnalul RMN al protonului este „scindat" prin interacțiunea cu protonii vecini. Această caracteristică, numită cuplaj spin-spin, permite determinarea poziției respectiv a numărului de protoni (echivalenți sau neechivalenți) din moleculă. Nucleele atomilor suferă variații uşoare în funcție de mediu electromagnetic în care se află aceştia.

Un exemplu este cel a protonilor aflați pe catena laterală a unei peptide.

Hidrogenii de la grupările metil din catena laterală a valinei (A) vibrează diferit comparativ cu protonii din catena laterală a treoninei (B). Cu cât densitatea electronică de pe nucleul de hidrogen este mai mică, cu atât impactul câmpului magnetic asupra nucleului este mai mare respectiv frecvența este mai ridicată.



Schema 7.4. Exemple de nuclee de hidrogen localizate în zone cu densități electronice de sarcină diferite

Protonii din legătura peptidică (C) au o frecvență de vibrație mai ridicată comparativ cu protonii de tip A sau B. Acest fapt se datorează electronegativității atomului de azot și a posibilităților de conjugare din legătura peptidică, fapt care determină o scădere a densității electronice de pe protonul amidic respectiv la o expunere ridicată față de câmpul magnetic și implicit a unei vibrații mai intense.

Tehnica RMN se aplică și în cazul altor nuclee atomice (^{13}C, ^{15}N, ^{19}F sau ^{31}P). Deși izotopul ^{13}C are o abundență de 1% tehnica ^{13}C-RMN impune utilizarea de substanțe marcate cu ^{13}C sau unor magneți cu putere ridicată (500-600 MHz). Acest tip de RMN este utilizat la studiul zaharurilor, aminoacizilor sau acizilor grași. Spectrele ^{31}P-RMN sunt utilizate la studiul moleculelor fosforilate. Tehnica RMN poate fi utilizată pentru determinarea concentrației metaboliților din celulă. De exemplu, dehidrogenarea acil-CoA poate fi monitorizată prin ^{1}H-RMN iar reacțiile de fosforilare prin ^{31}P-RMN.

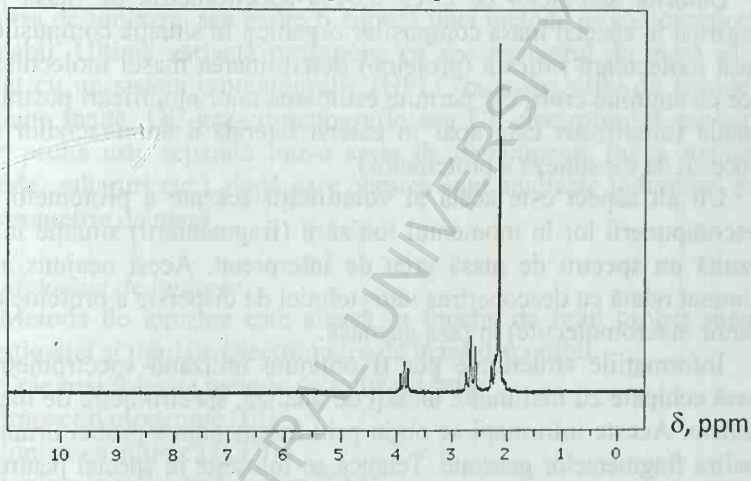
Pentru deplasarea chimică din proteine se urmăresc în special protonii din grupările amidice, protoni care se găsesc în zona 5,5-10,5 ppm. Deoarece numărul de legături peptidice este cu o unitate mai mic decât numărul aminoacizilor din lanțul polipeptidic, este foarte greu de identificat zona în care se deplasează un anumit proton dintr-o grupare amidică. Din acest motiv se impune creşterea rezoluției spectrului. În cele mai multe situații se apelează la spectrele bidimensionale. Aceste spectre pot fi obținute prin transferarea magnetizării dintre atomii cuplați. De exemplu, în cazul perechii ^{1}H-^{15}N se aduce la rezonanță atomul de azot şi se determină semnalul electromagnetic atât pentru acest atom cât şi pentru atomul de hidrogen vecin după ce acesta a intrat în rezonanță prin cuplare spin-spin cu atomul de azot vecin. Prin utilizarea tehnicilor multipulsatorii este posibil să se perturbe un nucleu şi să se observe efectele asupra stării spinilor de pe alt nucleu. Existența unor sisteme de achiziție moderne şi a unor magneți puternici respectiv a posibilităților de calcul (transformată Fourier) a făcut posibilă elucidarea structurii unor proteine sau unor complecşi proteici (GroEL-GroES sau ciclofilina A-ciclosporina A). Determinarea structurii proteinelor prin tehnica RMN constituie un domeniu de cercetare în plină dezvoltare. Peste 10000 de structuri proteice se găsesc în baza de date *Protein Data Bank* (http://www.rcsb.org/pdb/).

Dezavantajul tehnicii RMN constă în utilizarea unor cantități mai mari de proteină comparativ cu difracția cu raze X sau spectrometria de masă. Concentrația proteinei în soluția care mimează condițiile biologice (pH-ul, tăria ionică respectiv temperatura) este de ordinul mM, iar volumul soluției utilizate este de circa 0,5 ml.

Hidratarea proteinelor poate fi observată prin tehnica NOESY-RMN (NOESY – *engl.* Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, care constă în schimbarea intensității rezonanței datorită relaxării reciproce a spinilor nucleelor aflate în vecinătate cu perturbarea energiilor populației acestora). Astfel, pot fi observate interacțiunile între protonii din moleculele de apă şi cei aflați în legăturile peptidice.

Întrebări:

1. Care din următoarele metode spectroscopice permite determinarea numărului de atomi de carbon?
   a) Spectroscopia UV-Vis;
   b) Fluorimetria;
   c) RMN-ul.
2. Identificați aminoacidul pe baza spectrului ^1H –RMN.



Care sunt cuplările care apar?

Bibliografie:

1. Doucleff, M., Hatcher-Skeers, M. şi Crane, N.J. (2011) Poket Guide to Biomolecular NMR, Springer, Heidelberg, N.Y., USA.
2. Wüthrich, K. (2002) NMR studies of structure and function of biological macromolecules, Nobel Lecture.
3. Macomber, R.S. (1998) A complete introduction to modern NMR spectroscopy, John Wiley & Sons, NY, p. 252-277.
4. Rule, G.S. şi Hitchens, T.K. (2006) Fundamental of protein NMR spectroscopy, Springer, Dordrecht, Netherlands.
5. Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G., 3rd, Skelton, N.J. şi Rance, M. (1996) Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, Academic Press, NY.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. Miller, A. şi Tanner, J. (2008) Essential of Chemical Biology: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules, John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, NJ, USA.

7.5. Spectrometria de masă

Spectrometria de masă este o metodă de analiză a biomoleculelor caracterizată de înaltă precizie şi rezoluţie.

Datorită acurateţei de circa 0,01% spectrometria de masă poate confirma în special masa compuşilor organici. În situaţia compuşilor cu masă moleculară ridicată (proteine) determinarea masei moleculare se face cu anumite erori, dar permite estimarea unor modificări postranslaţionale (modificări care apar în catena laterală a aminoacizilor după procesul de biosinteză a proteinelor).

Un alt aspect este acela al volatilităţii scăzute a proteinelor şi a descompunerii lor în momentul ionizării (fragmentării) situaţie în care rezultă un spectru de masă greu de interpretat. Acest neajuns a fost eliminat odată cu descoperirea unor tehnici de dispersie a proteinelor (şi a altor macromolecule) în faza gazoasă.

Informaţiile structurale pot fi obţinute utilizând spectrometre de masă echipate cu mai multe unităţi de analiză, spectrometre de masă în tandem. Aceste informaţii se obţin prin fragmentarea probei urmată de analiza fragmentelor generate. Tehnica se foloseşte în special pentru elucidarea structurii compuşilor organici, a peptidelor sau oligonucleotidelor.

7.5.1. Principiile de funcţionare a spectrometrelor de masă

Spectrometrele de masă au în general trei componente majore: sursa de ionizare, analizorul şi detectorul.

În prima etapă molecula neutră este ionizată (în interiorul sursei de ionizare), iar ionii pozitivi rezultaţi se deplasează în câmp magnetic/electric unde sunt separaţi (analizaţi) pe baza raportului dintre sarcina şi masa moleculară (m/z). Ionii separaţi sunt detectaţi, iar semnalul este trimis unui sistem de date sub forma unui spectru în care sunt prezentate speciile în funcţie de valoarea raportului m/z şi abundenţa lor.

Analizorul şi detectorul unui spectrometru de masă poate avea în componenţa o sursă de ionizare suplimentară şi se află în incinte prevăzute cu sisteme de vid (10^{-5}-10^{-11} mmHg) Aceste incinte înlătură

posibilitatea interacțiunii ionilor probei cu moleculele de aer, în deplasarea lor de la sursa de ionizare spre detector. Toate operațiunile inclusiv introducerea probei se fac automat.

Introducerea probei

Modul de introducere al probei în sursa de ionizare se face în funcție de metoda de ionizare și de tipul probei. Proba poate fi introdusă direct în sursa de ionizare, sau poate fi supusă unei metode cromatografice în prealabil. Ultima variantă presupune ca spectrometrul de masă să fie cuplat cu un sistem cromatografic (HPLC-cromatografie de lichide la presiune înaltă, GC-gaz-cromatografie sau CE-electroforeză capilară), unde proba este separată într-o serie de componente (acizi nucleici, peptide, zaharuri etc.), după care acestea sunt analizate individual prin spectrometrie de masă.

Metodele de ionizare

Metoda de ionizare este aleasă în funcție de tipul probei supusă investigației și tipul de spectrometru de masă disponibil.

Cele mai folosite metode de ionizare sunt:

a) Impactul electronic (EI);
b) Ionizarea chimică (CI);
c) Ionizarea prin electrospray (ESI);
d) Ionizarea prin bombardament cu atomi rapizi (FAB);
e) Ionizarea prin desorbție în câmp (FD/FI);
f) Ionizare din matrice prin desorbție asistată de laser (*engl.* Matrix Assisted Laser Desorbtion Ionisation);
g) Ionizarea prin termopulverizare (TSP).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

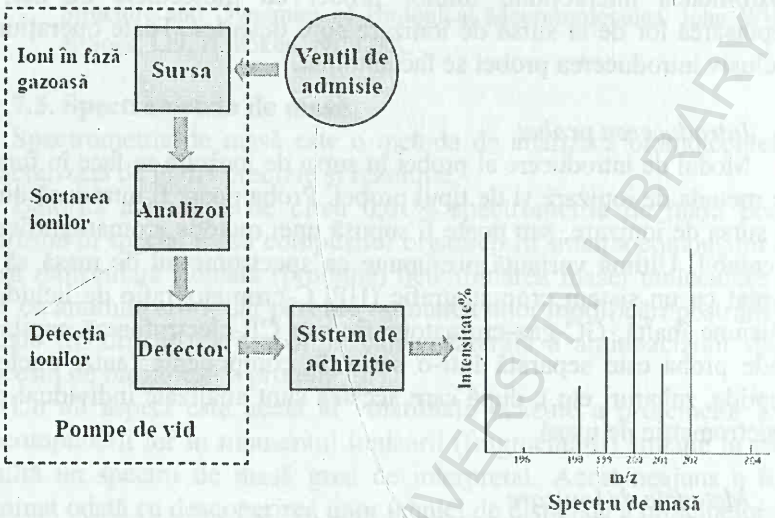


Figura 7.5. Componentele unui spectrometru de masă

Majoritatea metodelor oferă posibilitatea creării de ioni pozitivi şi negativi, în funcție de afinitatea pentru protoni a probei de analizat.

Metodele de ionizare utilizate în marea majoritate a analizelor biochimice sunt ionizarea prin electrospray (ESI) şi ionizarea din matrice prin desorbție asistată de laser (MALDI).

Analiza şi separarea ionilor

Principala funcție a unui analizor de masă este aceea de a separa ionii generați de către sursa de ionizare a spectrometrului de masă în funcție de raportul masă/sarcină (m/z). Există o varietate de analizoare de masă dintre care cele mai utilizate sunt: a) Analizoare de tip cvadripol; 2) Analizoare de tip timp de zbor (*engl.* time of flight-TOF); 3) Analizoare de tip capcană de ioni-cvadripolar; 4) Analizoare de tip capcană de ioni şi transformată Fourier.

Aceste analizoare de masă prezintă caracteristici diferite, incluzând intervalul m/z ce poate fi acoperit, acuratețea de măsurare a masei respectiv rezoluția ce poate fi atinsă. Compatibilitatea diferitelor

analizoare cu sistemele de ionizare variază de la caz la caz. De exemplu, toate analizoarele menționate pot fi utilizate în tandem cu ionizarea prin electrospray, în timp ce MALDI nu poate fi cuplat cu un analizor cvadripolar.

Spectrometrele de masă în tandem (MS-MS) sunt instrumente în care sunt prezente mai multe analizoare în scopul de a obține informații structurale și secvențiale. Instrumentele pot conține până la patru analizoare (de același fel sau diferite). Cele mai populare spectrometre de masă în tandem sunt: cvadripol-cvadripol, câmp magnetic-cvadripol sau cvadripol-„timp de zbor". În aceste spectrometre, molecula proteică este ionizată și măsurată (m/z) în primul spectrometru. Ionul molecular este izolat și trimis în al doilea spectrometru, unde datorită coliziunilor cu molecule unui gaz inert se scindează. Fragmentele rezultate pot fi analizate prin intermediul celui de-al doilea spectrometru.

În unele situații se poate cupla un al treilea spectrometru, instrument în care se analizează fragmentele obținute dintr-un singur fragment izolat rezultat din al doilea spectrometru. Spectrele rezultate sunt de tipul MS, MS/MS și/sau MS/MS/MS. Din datele obținute se determină secvența proteinei sau biomoleculei supusă analizei.

Detecția și înregistrarea ionilor probei

Detectorul monitorizează curentul de ioni, amplifică semnalul care este transmis la un sistem de achiziții și este înregistrat sub forma unui spectru de masă. În spectrul de masă valorile m/z ale ionilor sunt reprezentate în funcție de intensitate. În acest mod pot fi identificate numărul de componente din probă, masa moleculară a fiecărei componente și abundența relativă a diferitelor componente din probă. Detectorul trebuie să fie compatibil cu analizorul. Cel mai des folosite sunt fotomultiplicatorul, multiplicatorul de electroni sau placa de detecție cu microcanale.

7.5.2. Ionizarea prin electrospray (ESI)

Ionizarea prin electropulverizare (ESI) permite ionizarea biomoleculelor la presiune atmosferică (API) și este folosită în special la analiza moleculelor polare care au masă cuprinsă între 0,1 și 1.000 KDa. Schema de principiu a acestei metode este prezentată în figura 7.6.

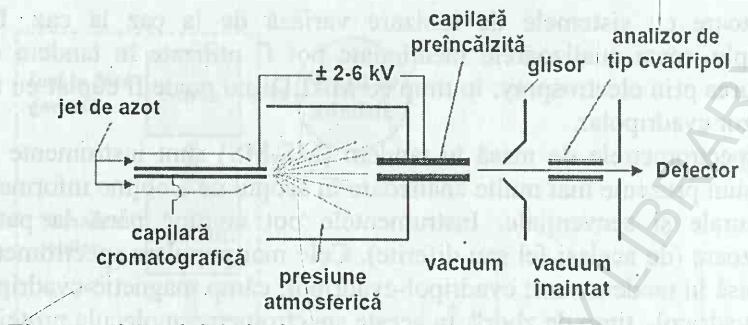


Figura 7.6. Modul de ionizare prin electrospray al probei supuse analizei.

În acest caz, proba este dizolvată într-un solvent polar şi pompată printr-o capilară îngustă din oţel inoxidabil cu un diametru D având circa 75-150 μm cu un debit de 1 μl/min-1 ml/min. La vârful acestei capilare, care este situat în interiorul sursei de ionizare, este aplicat un potenţial ridicat de 3-4 kV. Datorită câmpului electric creat, proba va forma un aerosol de picături încărcate electric, proces care este facilitat şi de introducerea co-axială a gazului purtător. Acest gaz care este de obicei azot are rolul de a direcţiona aerosolii care ies din capilară, în spectrometrul de masă. Aerosolii astfel formaţi, vor fi atraşi de un contra-electrod care are rolul de a focaliza fluxul format printr-o capilară. Picăturile încărcate electric se micşorează treptat (Fig. 7.7) datorită fenomenului de evaporare a solventului, datorat interacţiunii cu fluxul de gaz de uscare, care este menţinut la o temperatură ridicată (de regulă 300 °C).

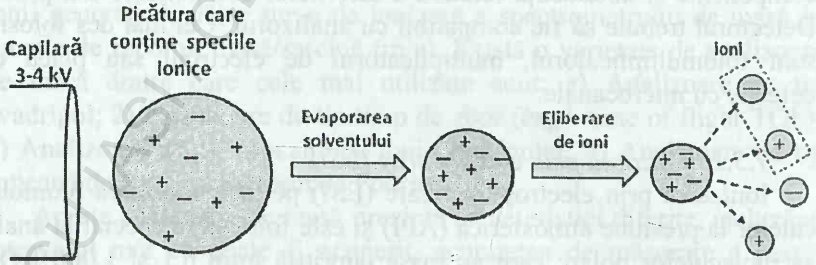


Figura 7.7. Procesul de eliberare a ionilor din solvent în faza gazoasă.

O parte din ionii eliberați din picături vor trece printr-un orificiu, într-o regiune în care este menținută o valoare scăzută a presiunii (aproximativ 1 milibar), valoare numită vid intermediar. De aici, ionii vor trece printr-un alt orificiu, spre analizorul de masă al instrumentului unde valoarea presiunii este mult mai mică (10^{-4}-10^{-5} milibari) numită vid înaintat. Diferența de potențial aplicată este optimizată în funcție de natura probei de analizat.

Ionizarea prin electrospray este o tehnică analitică foarte sensibilă, însă sensibilitatea sa este micșorată de prezența soluțiilor tampon nevolatile și a altor aditivi.

În cazul ionizării pozitive, este adăugată o cantitate mică de acid formic, acid acetic sau acid trifluoracetic pentru a ajuta protonarea moleculelor din probă, în timp ce pentru ionizarea negativă, pentru deprotonare, se folosesc soluții de amoniac sau amine volatile.

Proteinele și peptidele sunt de obicei analizate în modul de ionizare pozitiv iar oligonucleotidele și zaharidele sunt analizate în condiții de ionizare negativă. În ambele cazuri, scara m/z trebuie calibrată folosind o probă standard similară cu proba de analizat (de exemplu o proteină de calibrare pentru o probă necunoscută de proteină), aplicând ulterior o corecție de masă.

În ionizarea prin electrospray, moleculele peptidice sau proteice cu masa mai mică de 1200 Da dau naștere la ioni moleculari cu o singură sarcină electrică, în cazul ionizării pozitive (protonare) de forma $(M+H)^+$, iar în cazul ionizării negative (deprotonare) ioni moleculari negativi de forma $(M-H)^-$.

Un exemplu al acestui tip de analiză este redat în spectrul de masă al pentapeptidei leucin-encefalina (YGGFL = tirozil-glicil-glicil-fenilalanil-leucină). Formula moleculară a acestui compus este $C_{28}H_{37}N_5O_7$, iar masa moleculară mono-isotopică calculată este de 555.2692 Da. În spectrul de masă (Fig. 7.8) se observă o abundență mare a ionilor la m/z = 556.1, ceea ce corespunde ionului molecular protonat $(M+H)^+$.

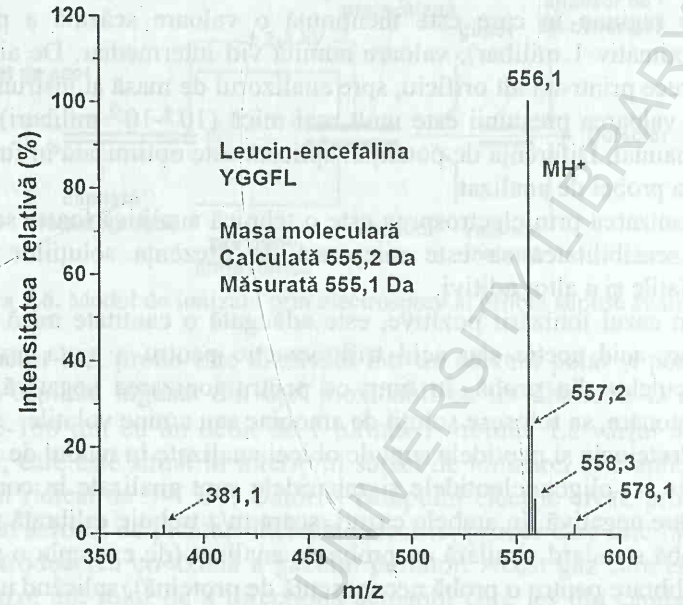


Figura 7.8. Spectru de masă al leucin-encefalinei-YGGFL (ionizare pozitivă).

În spectrul de masă apar şi alţi ioni, cu intensităţi mai mici (aproximativ 25% din intensitatea semnalului ionului molecular) la valori ale raportului m/z = 557.2. Aceste semnale indică faptul că un atom de carbon ^{12}C a fost înlocuit de un atom ^{13}C, un izotop natural cu masă atomică mai mare. Intensitatea semnalului din spectru datorat acestui izotop este în strânsă concordanţă cu abundenţa relativă a izotopului, oferind în acest fel informaţii utile în privinţa numărului de atomi de carbon din molecula respectivă.

Faptul că semnalul datorat ^{13}C este cu o unitate atomică de masă (Da) mai mare decât cel cu ^{12}C, este o dovadă a faptului că ionul are o singură sarcină (z=1) electrică, iar dacă ionul ar fi dublu încărcat (z=2), atunci diferenţa ar fi de doar 0.5 Da. De asemenea, în spectrul de masă prezentat mai apare şi un semnal la m/z = 578.1, valoare mai mare cu 23 Da decât masa moleculară calculată. Acest semnal (de intensitate

mică) este datorat ionilor formaţi cu cationii de sodiu, sub forma unui aduct de forma $(M+Na)^+$. Aducţi similari se formează cu cationii de potasiu ($+A_K=39$) şi ionii de amoniu ($+M_{NH4}^+=18$), în modul pozitiv de ionizare şi ionii clorură ($+A_{Cl}=35$) în modul negativ de ionizare. Ionizarea prin electrospray este cunoscută ca o metodă de ionizare nedistructivă, deoarece ionizarea probei are loc prin adiţia sau îndepărtarea unui proton, energia rămasă fiind insuficientă pentru a provoca fragmentarea ionilor.

Moleculele unei probe cu masă moleculară mai mare de 1200 Da dau naştere unor ioni moleculari cu multiple încărcări electrice de tipul $(M+nH)^{n+}$ în cazul ionizării pozitive şi $(M-nH)^{n-}$, în modul de ionizare negativ.

Proteinele prezintă multe situsuri care pot fi expuse protonării precum atomii de azot amidici (în mod teoretic) sau în cazurile în care sunt prezenţi în moleculă aminoacizi precum lizina şi arginina, care prezintă grupări funcţionale aminice primare.

Un exemplu de formare a sarcinilor multiple fenomen caracteristic ionizării prin electrospray este prezentat în spectrul de masă, în modul pozitiv (Figura 7.9), al lizozimului, o proteină extrasă din albuşul de ou.

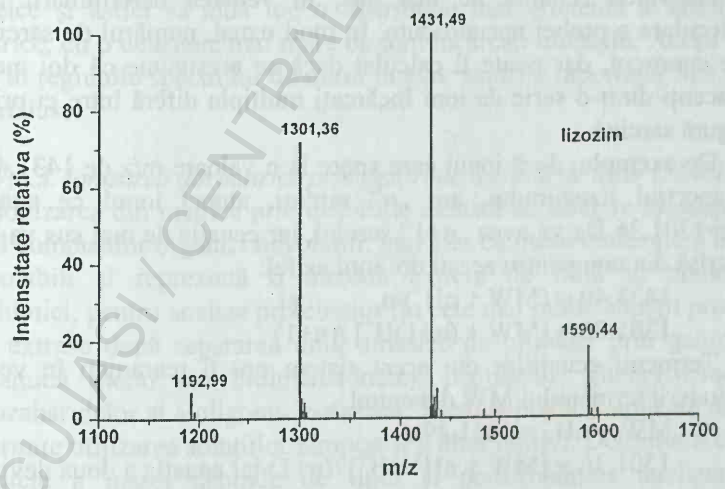


Figura 7.9. Spectrul de masă ESI-MS al lizozimului adaptat din Protea®.

Proba a fost analizată într-o soluție de concentrație 1 pmol/µl (metanol : acid acetic 0,1 M =1:1). Spectrul de masă din figura 7.7 prezintă o distribuție a semnalelor m/z de tip gaussian între 1192.99 Da până la 1590.44 Da. Fiecare pic din spectru reprezintă molecula intactă a proteinei, dar cu diferite încărcări electrice (protoni adiționali). În acest caz, lățimea semnalului este mai mare decât cea care apare în cazul speciilor cu o singură sarcină electrică (de exemplu în spectrul de masă al leucin-encefalinei), deoarece semnalele asociate fiecărui pic datorate izotopilor nu au o rezoluție bună precum în cazul ionilor mono-încărcați.

Valorile raportului m/z pot fi exprimate astfel:

$$m/z = (MW + nH^+)/n,$$

unde: m/z = raportul masă /sarcină de pe abscisă;

MW = masa moleculară a probei;

n = numărul întreg de sarcini de pe ioni;

H = masa atomică a protonului=1.008 Da.

Dacă numărul de sarcini electrice de pe un ion este cunoscut, atunci este nevoie doar de citirea valorii m/z de pe abscisa spectrului de masă şi rezolvarea ecuației de mai sus, în vederea determinării masei moleculare a probei necunoscute. În mod uzual, numărul de sarcini nu este cunoscut, dar poate fi calculat dacă se presupune că doi membri adiacenți dintr-o serie de ioni încărcați multiplu diferă între ei printr-o singură sarcină.

De exemplu, dacă ionul care apare la o valoare m/z de 1431,49 Da în spectrul lizozimului, are „n" sarcini, atunci ionul ce apare la m/z=1301,36 Da va avea „n+1" sarcini, iar ecuația de mai sus va putea fi scrisă din nou pentru acești doi ioni astfel:

$1431{,}49 = (MW + nH^+)/n$, şi

$1301{,}36 = [MW + (n+1)H^+]/(n+1)$

Termenii ecuațiilor din acest sistem pot fi rearanjați în vederea excluderii termenului MW devenind:

$MW + nH^+ = 1431{,}49n$

$1301{,}36 = [MW + nH^+ + H^+]/(n+1)$ iar ecuația a doua devine

1301,36 = [1431,49n + 1,008] /(n+1) de unde se pot calcula numărul de sarcini, n = 10, de pe ionul cu raportul m/z=1431.49

Pe baza valorii lui n se poate calcula masa moleculară (MW) a proteinei din prima ecuație inițială.

$1431.49 = (MW + 10H^+)/10 \Rightarrow \Rightarrow MW = 14304.8$ Da

Masa moleculară a lizozimului, dedusă din spectrul de masă, corespunde masei moleculare teoretice (bazate pe masele atomice) fiind de 14305.14 Da. Izotopii individuali se disting mai greu în cazul ionilor cu un număr mare de sarcini multiple şi din acest motiv în cazul acestei metode de ionizare se determină masa moleculară medie a proteinei. În cazul de față acuratețea de măsurare este de +/- 0.34 Da (0,003% din masa moleculară măsurată) deoarece s-a folosit un spectometru de masă de rezoluție înaltă.

În stare nativă, pliată, proteinele tind să formeze ioni încărcați multiplu, dar cu un număr redus de sarcini (de obicei două sau trei sarcini). Acest fenomen este indus de plierea proteinelor, când situsurile capabile să ionizeze (să accepte un proton) devin inaccesibile. În astfel de cazuri, creşterea tensiunii aplicate din capilară în care se află proba, poate conferi suficientă energie necesară despachetării moleculei proteice şi astfel să aibă loc o distribuție mai eficientă a sarcinilor electrice, cu o densitate mai mare de ioni încărcați multiplu. Aceşti ioni apar în regiunile spectrului de masă în care valorile raportului m/z sunt mai reduse.

7.5.3. Ionizarea din matrice prin desorbție asistată de laser (MALDI)

Ionizarea din matrice prin desorbție asistată de laser se foloseşte în cazul compuşilor organici nevolatili, mai ales cu mase moleculare mari, termolabili şi reprezintă o metodă extrem de utilă în domeniul biochimiei, pentru analiza proteinelor (în cele mai multe situații probele sunt extrase după separarea unui amestec de proteine prin geluri de acrilamidă mono sau bidimensionale), peptidelor, glicoproteinelor, oligozaharidelor şi a oligonucleotidelor. Metoda poate fi aplicată direct şi permite utilizarea soluțiilor tampon şi a altor aditivi. Determinarea cu acurateţe a masei depinde de tipul şi performanţele analizorului

spectrometrului de masă, dar instrumentele moderne sunt apte să măsoare masele moleculare de până la 40000 Da cu o eroare de 0,01%.

Acest tip de ionizare (Figura 7.8) se bazează pe bombardarea moleculelor probei cu un fascicul laser, care determină ionizarea probei. Proba este în prealabil amestecată cu o matrice cu capacitate de absorbție crescută, în vederea obținerii unor rezultate performante, acestea sunt cu atât mai bune cu cât concentrația probei este mai redusă.

Matricea transformă energia fasciculului laser în energie de excitare, ceea ce determină pulverizarea moleculelor probei și matricei situate la suprafață. În acest fel transferul de energie este eficientizat, dar moleculele de analizat sunt supuse unei cantități mari de energie directă ce poate determina descompunerea lor. Detecția moleculelor de analizat depinde de alegerea corectă a matricei. Există diverși compuși organici utilizați ca matrice în MALDI (Figura 7.11).

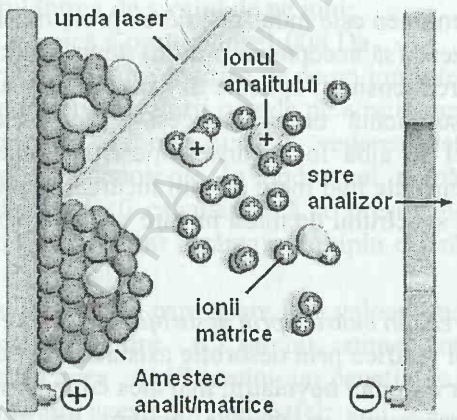


Figura 7.10. Reprezentarea schematică a ionizării MALDI.

La alegerea matricei de ionizare compusul trebuie să îndeplinească anumite condiții:

- să fie solubil în același tip de soluție ca și analitul (dacă acest lucru nu este posibil, analitul și matricea trebuie așezate în straturi diferite pe plăcuță);

- să prezinte o absorbție ridicată în domeniul lungimii de undă a radiației laser utilizate (deoarece cercetările s-au concentrat asupra domeniului de radiații ultra-violet, alegerea matricei a fost limitată la compuși aromatici substituiți cu grupări atrăgătoare de electroni);
- să fie inert din punct de vedere chimic față de moleculele de analizat;
- să sublimeze ușor, deoarece proba trebuie introdusă sub vid pentru a realiza analiza spectrometrică de masă.

Majoritatea spectrometrelor de masă cu surse de ionizare MALDI sunt dotate cu un fascicul laser pulsatoriu cu azot, la o lungime de undă de 337 nm. Pe lângă matricile care sunt ionizate în domeniul UV există și matrici care pot fi ionizate în IR.

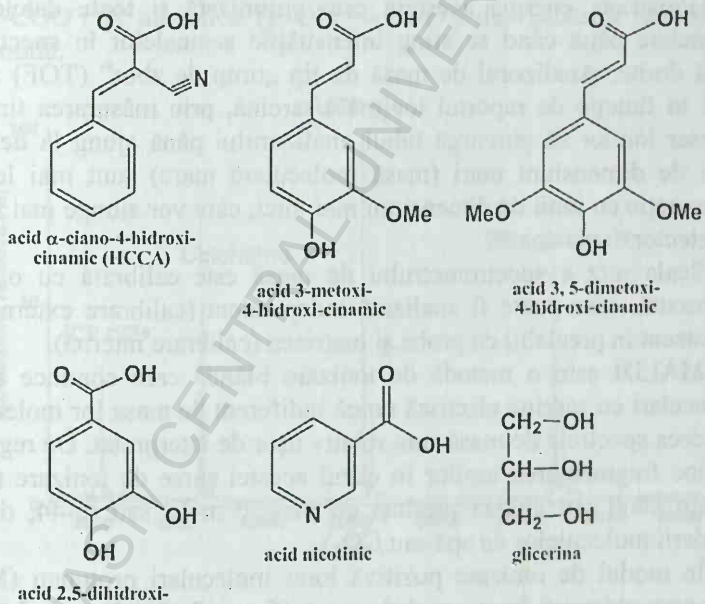


Figura 7.11. Compușii organici folosiți drept matrice în tehnica MALDI.

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Proba este inițial dizolvată într-un solvent volatil adecvat, în prezența acidului trifluoracetic, dacă se dorește o ionizare pozitivă, cu o concentrație de 10 pmol/µl, iar o mică cantitate din această soluție stoc (1-2 µl) se preia și se amestecă cu un volum egal de soluție, ce conține matrice în exces. O gamă variată de compuși pot fi folosiți drept matrice în MALDI. De exemplu, acidul sinapinic (acidul α-ciano-4-hidroxi-cinamic), folosit frecvent pentru analiza proteinelor și acidul 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamic folosit pentru analiza peptidelor. Un volum mic (1-2 µl) din soluția finală se aplică în regiunea destinată probei și este lăsat să se evapore la temperatura camerei (în funcție de temperatura ambiantă, presiunea de vapori, de regulă 30 – 45 minute) înainte de introducerea în spectrometrul de masă cu vid ridicat. După aplicarea fasciculului laser către porțiunea ce conține amestecul probă/matrice, energia acestuia este optimizată și toate datele sunt acumulate până când se ating intensitățile semnalelor în spectrul de masă dorite. Analizorul de masă de tip „timp de zbor" (TOF) separă ionii în funcție de raportul lor masă/sarcină, prin măsurarea timpului necesar ionilor să parcurgă tubul analizorului până ajung la detector. Ionii de dimensiuni mari (masă moleculară mare) sunt mai lenți în comparație cu ionii de dimensiuni mai mici, care vor ajunge mai repede la detector.

Scala m/z a spectrometrului de masă este calibrată cu o probă cunoscută, care poate fi analizată independent (calibrare externă) sau amestecat în prealabil cu proba și matricea (calibrare internă).

MALDI este o metodă de ionizare blândă care conduce la ioni moleculari cu sarcină electrică unică indiferent de masa lor moleculară, de aceea spectrele de masă sunt relativ ușor de interpretat. De regulă nu are loc fragmentarea ionilor în cazul acestei surse de ionizare (există situații când pot apărea produși cu masele m-18 sau m-44, datorită pierderii moleculelor de apă sau CO_2).

În modul de ionizare pozitivă ionii moleculari protonați $(M+H)^+$ sunt preponderenți în spectrul de masă (figura 7.12), dar pot fi însoțiți de unii aducți ce se formează în prezența unor săruri, de ioni moleculari cu sarcina electrică dublă ce apar la jumătatea valorii m/z și urme de specii dimerice la aproximativ dublul valorii lui m/z caracteristică

speciei de analizat. Ionizarea pozitivă este folosită curent pentru analiza proteinelor şi peptidelor.

În cazul ionizării negative ionii moleculari deprotonaţi $(M-H)^-$ sunt de regulă specia cea mai abundentă, dar pot fi însoţiţi în spectrul de masă de aducţi formaţi cu urme de săruri şi de materiale dimerice sau specii cu încărcare electrică dublă. Ionizarea negativă este foarte utilă în cazul analizei unor compuşi din clasa oligonucleotidelor şi oligozaharidelor.

Dacă proba de analizat conţine grupări funcţionale uşor protonabile cum ar fi grupările aminice ($R\text{-}NH_2 + H^+ \rightarrow R\text{-}NH_3^+$) din proteine sau peptide, atunci se va efectua detecţia ionilor pozitivi.

În cazul în care specia analizată conţine grupări funcţionale capabile să cedeze un proton, cum sunt grupările carboxilice ($R\text{-}COOH \rightarrow R\text{-}COO^-$) şi alcoolice ($R\text{-}OH \rightarrow R\text{-}O^-$) din zaharide sau oligonucleotide.

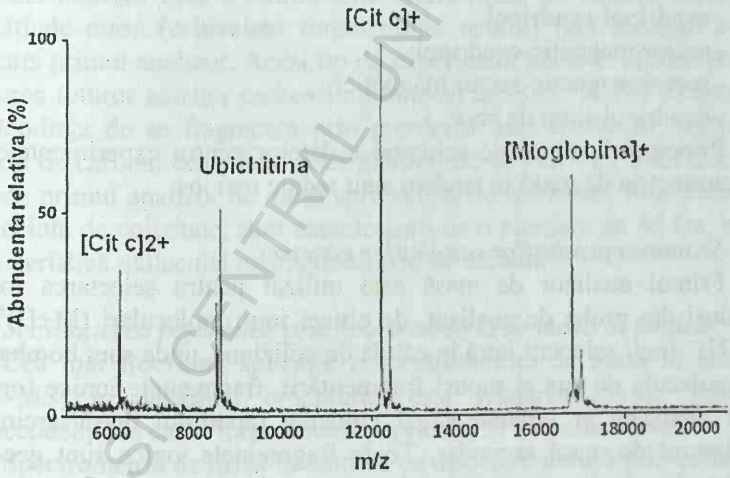


Figura 7.12. Spectrul de masă MALDI-TOF al unui amestec de ubichitină, citocrom c şi mioglobină utilizând DNB drept matrice. Spectrul prezintă şi specii de citocrom c dublu încărcate

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.5.4. Spectrometria de masă în tandem: informații privind structura și secvența compușilor folosind spectrometria de masă

Spectroscopia de masă în tandem (MS-MS) este utilizată pentru obținerea de informații structurale despre un compus, prin fragmentarea ionilor probei în incinta spectrometrului de masă și identificarea fragmentelor ionice rezultate. Aceste informații pot fi corelate pentru a oferi detalii asupra structurii moleculei inițiale. Spectroscopia de masă în tandem permite detecția componentelor din amestecurile complexe în funcție de modul de fragmentare caracteristic acestora.

Un spectrometru de masă în tandem este un spectrometru de masă ce conține mai mult de un analizor de masă, de cele mai multe ori două. Cele două analizoare sunt separate de o celulă de coliziune, în care se introduce un gaz inert (argon, xenon), numit gaz de coliziune, care are rolul de a ciocni ionii analitului, determinând în acest fel fragmentarea acestora. Analizoarele de masă pot fi de același tip sau diferite, cele mai uzuale combinații sunt:

- cvadripol-cvadripol;
- sector magnetic-cvadripol;
- sector magnetic-sector magnetic;
- cvadripol-timp de zbor.

Principalele tipuri de achiziție a datelor pentru experimentele din spectrometria de masă în tandem sunt redate mai jos:

Scanarea produșilor sau ionilor generați

Primul analizor de masă este utilizat pentru selectarea ionilor produși din proba de analizat, de obicei ionii moleculari $(M+H)^+$ sau $(M-H)^-$. Ionii selectați intră în celula de coliziune, unde sunt bombardați cu molecule de gaz și supuși fragmentării, fragmentele ionice formate sunt analizate și separate după valoarea raportului masă/sarcină de analizorul de masă secundar. Toate fragmentele ionice sunt generate direct din ionii precursori selectați, producând astfel un mod de fragmentare specific compusului investigat.

Acest tip de experiment este util pentru a caracteriza moleculele organice cu masa moleculară mică și pentru generarea informațiilor privind secvențele peptidice.

Scanarea ionilor precursori sau parentali

În această situație primul analizor permite transmisia tuturor ionilor de analizat, în timp ce al doilea analizor este reglat să monitorizeze fragmente ionice specifice generate prin ciocnirea ionilor din probă în celula de coliziune. Acest tip de experiment este utilizat în scopul monitorizării grupelor funcționale ale compusului analizat dintr-un amestec, prin analiza fragmentelor ionice uzuale rezultate. De exemplu peptidele glicozilate dintr-un amestec rezultat în urma digestiei în prezența tripsinei, hidrocarburile alifatice din extracte uleioase sau compușii glicozidici din urină pot fi evidențiați prin această metodă.

Scanarea pierderii constante neutre

Acest tip de analiză implică atât scanarea cu ambele analizoare de masă, cât și colectarea datelor, pe întreg intervalul rapoartelor m/z, dar cele două analizoare sunt calibrate astfel încât cel de al doilea să permită trecerea doar a ionilor care diferă printr-un anumit număr de unități de masă (echivalent fragmentului neutru) față de ionii ce au parcurs primul analizor. Acest tip de experiment poate fi utilizat pentru dozarea tuturor acizilor carboxilici dintr-un amestec. Acizii carboxilici au tendința de se fragmenta prin pierderea unei molecule neutre de dioxid de carbon, echivalent unei pierderi de 44 Da. Toți ionii trec inițial de primul analizor de masă spre celula de coliziune. Ionii rezultați din celula de coliziune, sunt caracterizați de o pierdere de 44 Da, masa caracteristică moleculei neutre de dioxid de carbon.

Secvențierea peptidelor prin spectrometria de masă în tandem

Cea mai frecventă aplicație a spectrometriei de masă în tandem (MS-MS) în domeniul biochimiei este scanarea ionilor generați (descendenți) în cazul fragmentării peptidelor și a nucleotidelor.

Spectrometria de masă în tandem cu disociere indusă prin coliziune (CID) este una dintre cele mai utilizate metode în scopul determinării secvenței peptidice.

Metode alternative precum disocierea indusă la suprafață (SID) și disocierea prin captură de electroni (ECD) sunt disponibile, dar nu sunt la fel de frecvent folosite precum CID.

B. C. U. „M. EMINESCU" IAȘI
CHIMIE

Principiul acestei tehnici de analiză (MS-MS prin CID) constă în selectarea ionului precursor în primul analizor de masă (MS1) şi focalizarea acestui ion către o celulă de coliziune. În celula de coliziune este introdus gazul de coliziune, care va ciocni moleculele probei. În timpul acestor ciocniri energia ionului precursor va creşte, acesta trecând într-o stare superioară din punct de vedere energetic, instabilă. În consecinţă, ionul precursor disociază (se fragmentează) de unde şi denumirea tehnicii de disociere indusă prin coliziune. Masele ionilor generaţi în urma fragmentării sunt determinate în cel de al doilea analizor de masă (MS2). Acest tip de disociere se poate realiza atât la energii joase cât şi la valori ridicate ale energiei. Disocierea unei molecule peptidice în cazul folosirii unui cuplu de analizoare de masă triplu-qvadripol (triplu-quad) sau capcană ionică (IT) este în general cuprinsă în domeniul 10-100 eV, în timp ce analizoarele de masă de tipul sectoarelor magnetice folosesc energii de disociere de ordinul keV, procedeu numit disociere indusă prin coliziune de înaltă energie.

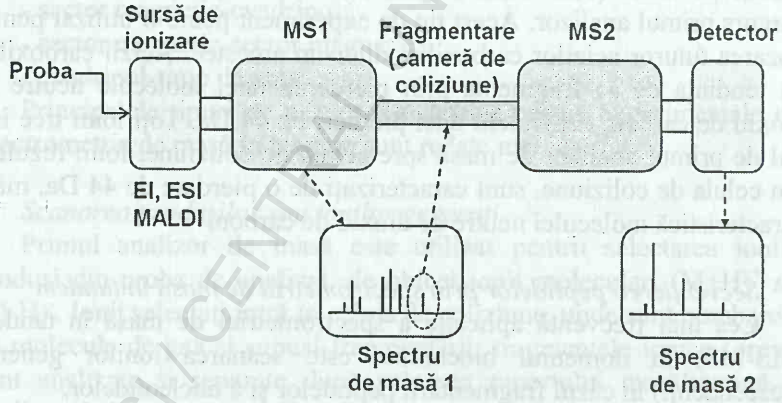


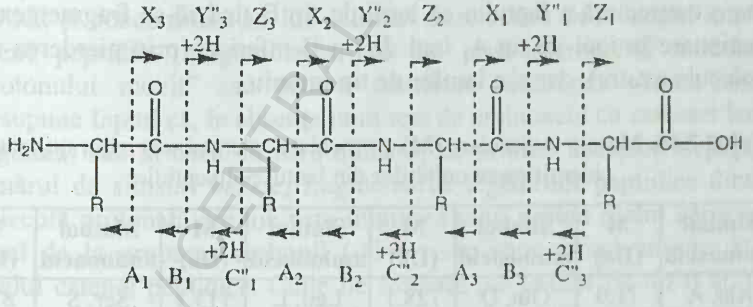
Figura 7.13. Reprezentarea schematică a unui spectrometru de masă în tandem MS-MS cu disociere indusă prin coliziune

Trei tipuri de legături pot fi scindate de-a lungul lanţului peptidic, NH-CH, CH-CO şi CO-NH. Fiecare scindare a unei legături conduce la două specii, una neutră şi alta încărcată, doar speciile încărcate fiind cele monitorizate de către spectrometrul de masă. Sarcina se poate

localiza pe oricare dintre cele două fragmente formate în funcție de afinitatea relativă pentru protoni a celor două fragmente. Spectrul de fragmentare al unei peptide, obținut în urma unei disocieri induse prin coliziune la valori mici ale energiei conține pe lângă ionii corespunzători pierderii unei molecule mici neutre și fragmentele rezultate în urma clivării legăturii peptidice.

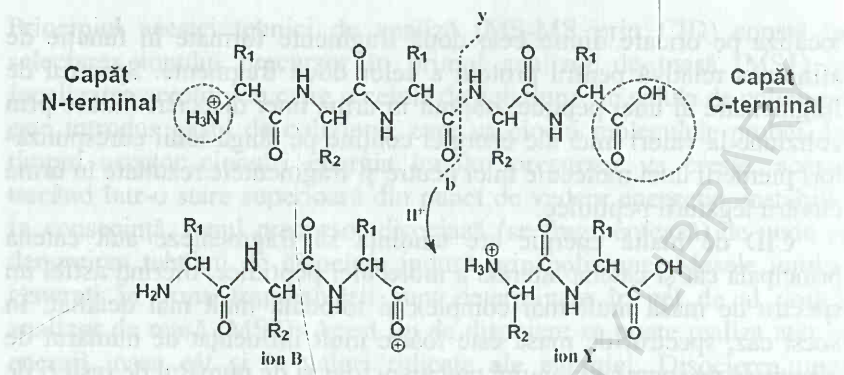
CID de înaltă energie are tendința să fragmenteze atât catena principală cât și catena laterală a moleculei peptidice, oferind astfel un spectru de masă mult mai complex și totodată mult mai detaliat. În acest caz, spectrul de masă este foarte mult influențat de numărul de sarcini de pe suprafața ionului precursor, dar și de numărul de resturi de aminoacizi cu caracter bazic cât și de prezența sau absența resturilor de aminoacizi cu caracter acid la nivelul acestuia.

Există șase tipuri (schema 7.14) de fragmente ionice posibile pentru fiecare rest de aminoacid din lanțul polipeptidic. Aceste fragmente sunt notate în figura după cum urmează: ionii A, B, C cu sarcina localizată pe fragmentul N-terminal, respectiv X, Y, Z pentru fragmentele rezultate la capătul C-terminal.



Schema 7.14. Reprezentare a lanțului polipeptidic și a posibilităților de clivare

În cazul utilizării disocierii prin coliziune de energie joasă, cele mai frecvente situsuri de scindare sunt legăturile amidice -CO-NH-, iar ionii rezultați sunt de tip B sau Y (schema 7.15).



Schema 7.15. Reprezentare schematică a scindării unei legături peptidice dintr-o pentapeptidă cu formarea ionilor B şi Y.

Peptidele rezultate în urma digestiei proteinei investigate cu tripsina denumite şi peptide triptice prezintă la nivelul capătului C-terminal un rest de aminoacid bazic (arginină sau lizină), fiind favorizată formarea ionilor de tip Y''^{+} (ioni cu două sarcini pozitive). Abundența mai ridicată a ionilor de tip Y'' față de ionii de tip B în spectrul de masă este o consecință a faptului că ionii de tip B tind să se fragmenteze în continuare în ioni de tip A, ioni de tip B inferiori (prin pierderea unei molecule neutre), dar şi a ionilor de tip imoniu.

Tabel 7.16. Masele moleculare (M) „trunchiate" ale aminoacizilor utilizate la identificarea unităților din lanțul polipeptidic

Simbol aminoacid	M (Da)	Simbol aminoacid	M (Da)	Simbol aminoacid	M (Da)	Simbol aminoacid	M (Da)
Ala, A	71.0	Gln, Q	128.1	Leu, L	113.1	Ser, S	87.0
Arg, R	156.1	Glu, E	129.0	Lys, K	128.1	Thr, T	101.0
Asn, N	114.0	Gly, G	57.0	Met, M	131.0	Trp, W	186.1
Asp, D	115.0	His, H	137.1	Phe, F	147.1	Tyr, Y	163.1
Cys, C	103.0	Ile, I	113.1	Pro, P	97.1	Val, V	99.1

Secvența peptidică poate fi determinată și prin analiza diferențelor între picurile din același spectru de masă. Diferențele care apar între picurile vecine ale ionilor de același tip poate fi utilizată pentru identificarea aminoacidului lipsă.

Există diverse strategii de diferențiere a ionilor produși. Una dintre aceste strategii este marcarea radioactivă a ionilor Y'' formați cu izotopul ^{18}O. În acest sens, digestia proteinei este realizată într-un amestec $H_2{}^{16}O : H_2{}^{18}O = 1 : 1$, astfel încât peptidele rezultate, mai puțin cele care conțin capătul carbon terminal al proteinei, prezintă o diferență de 2 Da la nivelul distribuției izotopice.

Modificările post-translaționale, precum fosforilările și glicozilările pot fi determinate și localizate de asemenea prin intermediul spectrometriei de masă MS/MS în tandem. Diferențele ce apar la nivelul ionilor de tip B sau Y''sunt caracteristice unui anumit tip de modificare post-translațională.

Fragmentarea peptidelor prin intermediul coliziunii la energie joasă este presupusă a fi mediată de sarcină, însemnând că este nevoie de un proton mobil pentru a realiza inițierea reacției de fragmentare. În situația în care unul sau mai mulți protoni sunt acceptați de către peptidă și concomitent au loc scindări neselective de-a lungul întregii catene peptidice, fragmentarea are loc prin intermediul modelului „protonului mobil" sau proton distribuit heterogen. Acest model presupune faptul că, în absența unui rest de aminoacid cu caracter bazic (arginina) sau în cazul în care numărul de protoni acceptați depășește numărul de situsuri bazice, fragmentarea legăturilor peptidice dintr-o moleculă protonată are loc prin migrarea unui proton mobil către oxigenul de la gruparea carbonil (-C=O) sau spre azotul amidic de la nivelul catenei peptidice. Căile de formare ale ionilor de tip B și Y'', care sunt urmate prin intermediul unei energii mici, sunt apoi asistate de fragmentări induse de sarcină, catalizate de proton.

Ionizarea prin electrospray este capabilă să genereze ioni multiplu încărcați, drept urmare sarcinile multiple de pe un ion precursor pot fi distribuite la nivelul ionilor produși în diverse moduri. De exemplu, un ion precursor încărcat dublu poate genera un ion de tip B și unul de tip Y'', fiecare cu o singură sarcină, sau unul dintre ei poate fi încărcat

dublu, iar celălalt neutru. Resturile de aminoacizi care tind să accepte un proton mobil precum histidina sau care sunt capabile să cedeze un proton precum acidul aspartic vor avea un efect semnificativ asupra fragmentării moleculei peptidice din care fac parte. Acceptarea sau cedarea unui proton mobil de către resturile de aminoacizi de acest tip poate iniția fragmentări specifice ale moleculei peptidice protonate la capătul C-terminal generând o pereche de ioni B/Y'' abundentă în spectrul de masă.

Resturile de prolină (Pro) au de asemenea tendința de a promova fragmentarea legăturilor peptidice, dar la capătul N-terminal. Acest efect este datorat caracterului bazic mai pronunțat al legăturii peptidice la capătul N-terminal, numit în literatură „efectul prolinei". De asemenea, legătura amidică dintre glutamină (sau acidul glutamic) și glicină, existentă într-o peptidă, este capabilă să genereze ioni cu un randament ridicat.

Cunoașterea situsurilor predispuse clivării permite interpretarea spectrului de fragmentare al unei proteine intacte (nehidrolizate cu tripsina), deoarece utilizarea corectă a parametrilor instrumentului conduce la ruperea legăturilor amidice mai labile (cele care conțin Pro, Gln-Gly etc.).

Abilitatea de a prezice spectrul teoretic de fragmentare este un avantaj deosebit pentru spectrometria de masă MS/MS în tandem, automatizată, în care programele folosite sunt capabile să ofere o interpretare a spectrului. Deoarece majoritatea algoritmilor disponibili nu iau în considerare abundențele relative ale ionilor generați, implementarea unor astfel de facilități va conferi noi perspective în elucidarea structurii compușilor studiați.

7.5.5. Aplicații ale spectrometriei de masă

Spectrometrele de masă sunt utilizate atât în mediul academic, cât și în industrie. Mai jos sunt enumerate câteva aplicații ale spectrometriei de masă:

- biotehnologie: analiza proteinelor, peptidelor, oligonucleotidelor;
- industria farmaceutică: descoperirea medicamentelor, farmacodinamica și metabolismul medicamentelor;

- clinic: testarea neonatală a predispoziției la boli genetice, analiza hemoglobinei, testarea de medicamente;
- mediu: existența unor hidrocarburi policiclice și a unor derivați halogenați în apă, calitatea apei sau contaminarea alimentelor;
- geologie: compoziția uleiurilor.

În biochimie spectrometria de masă poate furniza informații legate de puritatea probei, modificările postranslaționale sau substituții ale aminoacizilor, calcularea numărului de punți disulfidice etc.

Identificarea proteinelor este una dintre aplicațiile spectrometriei de masă. Cei mai importanți ioni sunt ionii moleculari (M^+) sau ionii moleculari protonați $(M+nH^+)^{n+}$. Unii ioni moleculari sunt instabili și dau naștere la fragmente ionice cu mase moleculare mai mici.

După procesul de translație proteinele din celulă sunt adesea modificate prin atașarea covalentă a unor resturi la unele grupări funcționale (fosforilarea grupărilor hidroxil ale serinei sau tirozinei, atașarea de resturi de zahăr – glicozilarea – la serină, treonină sau $-NH_2$ amidic al asparaginei). Modificările chimice pot fi ușor detectate prin spectrometrie de masă: gruparea fosforil determină o creștere a masei moleculare cu circa 80, în timp ce un rest de glucoză o creștere de 180.

Alte aplicații ale spectrometriei de masă:

- monitorizarea unor reacții biochimice (reacții enzimatice inclusiv reacțiile de digestie și conversia substratului în produs de reacție);
- determinarea structurii primare a peptidelor sau proteinelor. Secvența de aminoacizi din peptidele și proteinele mici poate fi determinată prin spectrometrie de masă. Proba este ionizată și fragmentată la nivelul legăturii peptidice. Analiza fragmentelor produse conduce la determinarea secvenței de aminoacizi din polipeptida inițială;
- determinarea secvenței oligonucleotidelor utilizate în reacțiile PCR (vezi capitolul 4.5);
- monitorizarea schimbărilor conformaționale cu ajutorul tehnicilor de schimb izotopic, formarea complecșilor proteină-ligand în condiții fiziologice.

Probleme

1. Un student foloseşte spectrometria de masă la analiza unei peptide. Ce informaţii oferă spectrometrul de masă?
   a) Încărcarea particulelelor individuale;
   b) Numărul de resturi de aminoacizi încărcate pozitiv sau negativ;
   c) Masa moleculară a fragmentelor rezultate în urma desfacerii peptidei;
   d) Identificarea aminoacizilor componenţi;
   e) Spectrul de absorbţie în ultraviolet al peptidei.
2. Care din următoarele motoare de căutare permite analiza datelor analizate prin spectrometrie de masă?
   a) Mascot;
   b) Sequest;
   c) Profound;
   d) Toate.
3. Spectrometria de masă în tandem poate fi utilizată la determinarea secvenţei de aminoacizi dintr-o proteină:
   a) Adevărat;
   b) Fals.
4. Care dintre următoarele tehnici este mai exactă pentru determinarea masei moleculare a unei proteine?
   a) Cristalografia cu raze X;
   b) SDS-PAGE;
   c) Măsurarea presiunii osmotice;
   d) Spectrometria de masă.

Bibliografie:

1. Pramanik, B.N., Ganguly, A.K., Gross, M.L. (2002) Applied Electrospray Mass Spectrometry, Practical Spectroscopy Series, Vol 32, Decker, N. Ed, CRC Press, NY.
2. Cole, R.B. (2010) Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, 2nd Edition, john Wiley & Sons, NJ.
3. De Hofmann, E. şi Stroobant, V. (2001), Mass Spectrometry: Principles and Applications, 2nd edition, John Wiley & Sons, NY.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Burlingame, A., Carr, S. şi Baldwin, M. (2000) Mass Spectrometry in Biology and Medicine, Humana Press, Totowa, NJ.
5. Chait, B.T. şi Kent, S.B.H. (1992) Weighing naked proteins: A high-accuracy mass measurement of peptide and proteins, *Science,* **257**, 1885-1893.
6. Finehout, E.J. şi Lee, K.L. (2004) An introduction to mass spectrometry applications in biological research, *BAMBED*, **32**, 93-100.
7. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. şi Kunster, B. (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal. Bioanal Chem.*, **389**, 1017-1031.
8. Edwards, N.J. (2011) Protein Identification from a Tandem Mass Spectra Database Searching, *Methods in Molecular Biology*, **694**, 119-138.
9. Mann, M., Hendrickson, R.C. şi Pandley, A. (2001), Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 437-473.
10. Paša-Tolic, L. şi Lipton, M.S. (2009) Mass spectrometry of proteins and peptides: Methods and Protocols in Methods in Molecular Biology, Humana Press, NY, USA.
11. https://proteabio.com/products/PS-123
12. A Little Encyclopedy of Mass Spectrometry, Universitatea Ruprecht-Karls, Heidelberg, http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/encyclo-pedia.html

B. C. U. „M. EMINESCU" IAŞI
CHIMIE

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

TIPARUL EXECUTAT LA
IMPRIMERIA EDITURII UNIVERSITĂȚII
„ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
700511 Iași, Păcurari 9, tel./fax 0232 314947
Apărut: 2012
Comanda: 73

Informații și comenzi:
www.editura.uaic.ro
editura@uaic.ro

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE ÎN

LABORATORUL DE BIOCHIMIE

DE LA TEORIE LA EXPERIMENT

ROBERT V. GRĂDINARU
GABI DROCHIOIU

Lucrarea de față este rodul colaborării cu studenții în decursul a patru ani universitari. Scopul acestui îndrumar este de a oferi studenților o imagine de ansamblu asupra disciplinei şi de a le îmbunătăți abilitățile experimentale, îndreptându-le atenția şi către activitatea de cercetare din laboratorul de biochimie. Autorii au speranța că aceste lucrări vor apropia mai mult studenții de problematicile actuale şi vor permite acestora să abordeze noi provocări experimentale.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9 789736 406867
www.editura.uaic.ro

EDITURA UNIVERSITĂȚII „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAŞI